

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 12 月 19 日 (19.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/100441 A2

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00, [JP/JP]; 〒063-0001 北海道 札幌市 西区山の手 1 条 2 丁目 6-6 Hokkaido (JP).
38/00, 45/00, A61P 43/00 // A61K 38/18
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05485 (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (22) 国際出願日: 2002 年 6 月 4 日 (04.06.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2001-174919 2001 年 6 月 8 日 (08.06.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DनावEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 番 1 号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 濱田 洋文 (HAMADA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒064-0959 北海道 札幌市 中央区宮ヶ丘 2-1-3 0-6 0 2 Hokkaido (JP). 伊藤 克礼 (ITO, Yoshinori) [JP/JP]; 〒064-0921 北海道 札幌市 中央区南 2 1 条西 1 5 丁目 1-1-4 0 9 Hokkaido (JP). 山内 昭彦 (YAMAUCHI, Akihiko) [JP/JP]; 〒064-0804 北海道 札幌市 中央区南 4 条西 1 4 丁目 ライオンズマンション医大前 6 0 2 号 Hokkaido (JP). 森川 雅之 (MORIKAWA, Masayuki)
- 添付公開書類:
— 第 17 条(2)(a)に基づく宣言; 要約なし; 国際調査機関により点検されていない発明の名称。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 02/100441 A2

(54) Title: METHOD FOR TREATMENT OF VASCULAR REGENERATION

(54) 発明の名称: 血管再生療法

(57) Abstract:

明細書

血管再生療法

技術分野

本発明は、アンギオポエチンを血管新生遺伝子の前に発現または投与させることにより正常な血管新生を促進させる遺伝子治療に関する。

背景技術

近年、血管新生を誘導する増殖因子を用いた虚血疾患に対する治療に関する研究が進められている。例えば、心筋梗塞や急性虚血肢に対して、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) (Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16(2):181-91, 1992) や内皮細胞増殖因子 (endothelial cell growth factor; ECGF) (Pu, L. Q. et al., J. Surg. Res. 54(6):575-83, 1993) の投与による治療効果が調べられている。より最近では、血管内皮増殖因子／血管透過性因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF / vascular permeability factor; VPF) が、心筋虚血および肢虚血の動物モデルにおいて、血管形成を促進することが示されている (Takeshita, S. et al., Circulation 90(5 Pt 2):II228-34, 1994; Takeshita, S. et al., J. Clin. Invest. 93(2):662-70, 1994)。

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)は血管内皮細胞に特異的な増殖因子またVPF (Vascular Permeability Factor)血管透過性亢進因子として1989年に報告され現在VEGF A, B, C, D, Eに分類されている。VEGF Aはさらに6種類のサブタイプに分けられそのうち可溶性のVEGF121, -165が特に強い血管増殖能を持つとされ現在臨床応用されている。その作用は胎生期の血管形成にも関与し低酸素のもと増強され、さらにはNOの合成、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞の遊走にまで幅広い作用が報告されている。また一方で、VEGFの過剰発現は血管新生シ

グナルのバランスを崩し、血管腫様の脆弱毛細管を形成する可能性が考えられる (Carmeliet, P., *Nature Med.* 6, 1102-1103 (2000))。また、VEGFをin vivoで血管壁へ遺伝子導入した場合、血管腫様の内皮増殖により新生内膜の顕著な肥厚をもたらし、赤血球の血管外遊出 (extravasation) を引き起こし得る (Yonemitsu, Y., et al., *Lab. Invest.* 75, 313-323 (1996))。またレトロウイルスを用いて心筋に恒常的にVEGFを過剰発現させた場合でも同様の病理所見が観察されている (Lee, R. J., et al., *Circulation* 102, 898-901 (2000))。

主幹動脈が急性に閉塞することにより発症する急性重症虚血肢は主に血栓性閉塞に起因し、血管新生治療の対象となる重要な虚血疾患の一つで、急性重症虚血肢の後期治療の成績は極めて不良であり、多くの場合肢切断に至る。さらに肢切断に至った患者の生命予後も不良であり、1年生存率は50%と低い。このため胚性幹細胞 (VEGF受容体Flk-1陽性細胞) から血管を再生する手法が研究されている (Yamashita, J et al *Nature* 408(2):92-96, 2000)。血管は内皮細胞と壁細胞 (ペリサイトと平滑筋細胞) から成り、生体内では血管新生と退縮という動的な恒常性が維持されている。現在のところ、萌出 (sprouting)、分岐 (Branching)、融合 (fusion)、嵌入 (intussusception) などの複雑な変化がどのような分子機構で派生し、内皮細胞が移動 (migration)、離解 (detachment)、接着 (adhesion) などをタイミング良く機能的に実現するのは明らかになっていない (須田年生 実験医学5月号 19 (7):826-829 (2001))。

また、血管新生を誘導する増殖因子を用いたヒト遺伝子治療の臨床試験が開始され、これを重症の虚血肢の血管新生治療に対して臨床応用する研究が進められている。内皮細胞特異的な増殖因子である血管内皮増殖因子/血管透過性因子 (VEGF/VPF) はこの目的にかなう治療遺伝子と見なされている。閉塞性動脈硬化症やバージャー病に代表される末梢性血管疾患は、歩行時疼痛 (間歇性跛行)、安静時疼痛、下肢の組織障害 (壊死) などの臨床症状を示す。現在、末梢血管閉塞による安静時疼痛や虚血性潰瘍のある患者に対する有効な治療はなく、血管拡張

術および外科的血行再建術が困難な場合、下肢切断が余儀なくされている。そこで、血管新生因子による側副血行路形成による新しい治療法—治療的血管新生 (Therapeutic angiogenesis)—が提唱された。

実際、IsnerらはVEGF遺伝子を用いた血管新生を報告し、プラスミドベクターを用いたヒトへの遺伝子導入において比較的良好な治療効果が報告されている (Baumgartner, I., et al., *Circulation* 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., *J. Vasc. Surg.* 28, 964-973 (1998))。Isnerらは2つの異なった遺伝子治療臨床研究、1) カテーテルによる血管壁へのVEGF遺伝子導入、2) 注射器によるVEGF遺伝子の筋肉内への投与、を開始している。特に、後者では、70-80%の救肢率が報告されている。また血管内遺伝子導入および筋肉内遺伝子導入は、臨床試験においていかなる免疫反応による毒性も示さず、すでに100人以上の患者の治療が終了し、良好な成績が報告されている。VEGFの筋中遺伝子投与の有害な副作用や毒性レベルについては、現在のところほとんど報告がない。しかしながら、最近の報告によれば、トランスジェニック (Thurston, G., et al., *Science* 286, 2511-2514 (1999)) またはアデノウイルス (Thurston, G., et al., *Nature Med.* 6, 460-463 (2000)) によるVEGFの過剰発現が、遺伝子を導入された動物において異常な血管形成を起すこと、さらにプラスミドによる筋中へのVEGF遺伝子導入が、ヒトの虚血肢において一過的な浮腫を起すことが示されている (Baumgartner, I., et al., *Circulation* 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., *J. Vasc. Surg.* 28, 964-973 (1998) Baumgartner, I., et al., *Ann Intern Med.* ;132, 880-884, (2000))。

これまでに、VEGF単独投与による血管新生治療の欠点である血管透過性の亢進を改善する具体的かつ実用的な方法は全く知られていなかった。

発明の開示

本発明は、遺伝子治療または薬物治療においてVEGF単独投与による血管新生治

療の欠点である血管透過性の亢進を防止するために、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる方法を提供する。

VEGFファミリーと同様に血管内皮に特異的に作用する調節因子としてアンギオポエチン1 (Ang1) およびアンギオポエチン2 (Ang2)とその受容体Tie2が知られている。アンギオポエチンはTie-2チロシンキナーゼ受容体のリガンドであり血管新生の際の血管成熟に関与しているとされ、現在知られているサブタイプは4種類で1, 2がTie-2レセプターに結合する。Ang2はAng1の内在性のアンタゴニストとして働くことが推定されている(Saito, T.N.; Nature, Vol 376, 70-74, (1995))。Ang2はVEGFの働きにより選択的に誘導されることも知られている(Oh, H., et al., J. Biol. Chem., 274, 15732-15739 (1999))。Ang1のVEGFとの違いは血管内皮細胞の増殖能がなく、血管周皮細胞の結合に関与し、VEGFにみられる血管透過性の亢進が認められない点である。血管新生において内皮-周皮細胞の相互作用が重要な調節機構として働くことが知られている。周皮細胞は内皮細胞と接着することにより内皮細胞の分化や増殖抑制に働く。この機構にはTGF- β の活性化や囲い込みによる物理的バリアの形成が関与している(D'Amore, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4544-4548 (1989))。

本発明者等はKou-Gi Shyuらによるアンギオポエチンの効果検討の報告で、プラスミドpAng1またはpAng2をウサギモデルに投与しpAng1でAG score、血流、血管径、Capillary densityの改善をみたとの報告がある(Kou-Gi Shyu Circulation. 98, 2081-2087(1998))ことを参考にして、VEGFの働きが開始される前に、周皮細胞間の相互作用をあらかじめ誘導することの新生血管形成に対する有効性を独自に推定し実験をはじめ、その有効性を実証した。

一方、Thurstonらはアデノウイルスベクターを用いたアンギオポエチン1の導入がVEGFによる透過性亢進をおさえることをEvans Blueを用いた血管透過性評価モデルで示している(Gavin Thurston Nature Med, Vol 6, No 4, 460-463, (2000

))。しかしながら別の研究によるとプラスミドpAnglとpVEGFのウサギモデルへの同時投与による評価の結果、pVEGFプラスミド単独投与との差はほとんどないことが知られている。(Chae JK, Arterio Thromb Vasc Bio. 20, 2573-2578(2000))

本発明者等は両遺伝子の発現時期に注目し、アンギオポエチンをVEGF投与の前に投与することにより、浮腫の副作用が起らず、高い血管新生誘導効果が得られる局所投与手順を見いだした。

即ち、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起らず、高い血管新生誘導効果が得られる方法に関し、より具体的には、

(1) アンギオポエチンをコードするベクターまたはアンギオポエチンを血管新生遺伝子をコードするベクターまたは血管新生遺伝子がコードする蛋白投与前に投与処置することを特徴とした局所投与治療方法、

(2) 局所投与が筋肉内投与である、(1)に記載の方法、

(3) 血管新生遺伝子がVEGF121または165である、(1)または(2)に記載の方法、

(4) アンギオポエチンがアンギオポエチン1である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法を、提供するものである。

なお、本発明において「血管新生遺伝子」とは血管構成に関与する細胞の発生、遊走、増殖、成熟に直接、あるいは間接的に関わる遺伝子を意味する。

本発明者等は比較的安全性の高いプラスミドベクターを使用し、且つあらかじめAngiopoietin-1を、次いでVEGF165をウサギの下肢虚血モデルに筋肉内注射することにより血管透過性の少ない血管新生を鋭意検討し、治療効果を実証した。

治療対象疾患としては、例えば1)末梢の血管疾患、閉塞性動脈硬化症など、2)心疾患、狭心症・心筋梗塞など、3)腎疾患、腎炎など、4)肺疾患、神経疾患等があげられるが、その他血管新生の誘導が有効な疾患であれば特に制限はない。治療対象は虚血組織以外にも、厳密には必ずしも虚血組織とは言えなくても

、機能の良い血管が新たに形成または再編成されることで治療効果が得られるような病態や疾病をすべて含んでも良い。たとえば腎炎、糖尿病性の腎症。難治性の潰瘍。骨髄炎などの難治性の慢性ないし急性の感染。脳神経外科領域のモヤモヤ病、その他の脳神経外科領域の血管性疾患などがあげられる。投与部位となる筋肉は骨格筋、心筋、平滑筋、など、筋肉の種類を問わない。さらに投与部位は、筋肉に限定されない。皮膚（表皮、真皮）、動脈、静脈（門脈を含む）、リンパ管、腎臓、漿膜、骨膜、結合組織、骨髄、などへの投与を含む。局所投与により治療効果を実質的に実現する方法は、ベクターないし蛋白の直接投与、ないし、キャリア及び担体を用いた投与が挙げられる。担体は、生理的に許容できるもので、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などがあげられる。更に担体はこれらの生理的に許容される材料の混合組成物でも良い。注入手段は通常の医療用注射器または、体外および体内に留置される持続注入器などの工業製品があげられる。用いるベクターは生理的に許容されるベクターならば特に制限はなく、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、あるいは非ウイルスベクターも含めて、どんなベクターでも利用しうる。またベクターはベクターにより処理された患者自身の細胞の形態で利用することを含む。

図面の簡単な説明

- 図1は、プラスミドpCAccの構成を示す図である。
- 図2は、プラスミドpCAhVEGFの構成を示す図である。
- 図3は、プラスミドpCAhAng1の構成を示す図である。
- 図4は、ウサギ下肢虚血モデルに対する遺伝子導入のプロトコールを示す図で

ある。

図5は、虚血側のウサギ陰嚢を示す写真である。これらの写真から、V群では陰嚢浮腫と静脈拡張が遺伝子投与後のDay 15に生じたが、Ang1前投与はVEGFによって誘導される陰嚢浮腫を予防したことが示された。

図6は、6つの投与スケジュール群のDay 60での選択的内腸骨血管造影写真である。(A)、対照；(B)、V群；(C)、A群；(D)、A+V群；(E)、V-A群；(F)、A-V群。

図7は、虚血大腿筋におけるアルカリホスファターゼ染色によって多数の毛細血管ECが認められた代表的な顕微鏡写真である。(A)、対照；(B)、V群；(C)、A群；(D)、A+V群；(E)、V-A群；(F)、A-V群：バー=50 μ m。EC=内皮細胞。

図8は、虚血大腿筋における平滑筋細胞 α -アクチン染色によって平滑筋細胞に覆われた細動脈が認められた代表的な顕微鏡写真である。(A)、対照；(B)、V群；(C)、A群；(D)、A+V群；(E)、V-A群；(F)、A-V群：バー=50 μ m。

発明を実施するための最良の形態

実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

なお、本実施例においては、以下の文献に基本的に従って実験を行った。

- 1、 Satoshi Takeshita , J.Clin.Invest., Vol 93, 662-670, 199.
- 2、 Yukio Tsurumi, Circulation.1996;94: 3281-3290. ウサギ下肢モデルを確立しpVEGFの投与によってAG score、BPR、Capillary densityが改善されるのを示した。さらに上記に血流改善もとりにれた評価方法。
- 3、 Iris Baumgartner, Ann Intern Med.2000;132, 880-884. 実際90人にpVEGFを投与し下肢の浮腫についての評価方法。

4、 Kou-Gi Shyu Circulation.1998;98, 2081-2087. pAng1またはpAng2をウサギモデルに投与しpAng 1でAG score,血流、血管径、Capillary densityの改善についての評価方法。

5、 Gavin Thurston Nature Med, Vol 6, No 4, 2000, 460-463.

6、 G.Thurston , Science, Vol 286, 1999, 2511-2514. Evans Blueを用いた血管透過モデルでアデノを用いたAng1の導入がVEGFによる 透過性亢進をおさえる改善についての評価方法。

7、 Liubov Poliakova , J Thorac Cardiovasc Surg 1999;118, 339-347. アデノによるVEGFを導入したウサギモデルの陰嚢サイズと下腿周径の変化を経時的評価方法。

また、本実施例においては、データは平均±SEMとして表した。統計比較はANOVAに続いてBonferroni/Dunn検定を用いて行った。p<0.05の値を統計学的に有意とみなした。

[実施例1] 使用プラスミド

(1) VEGFをコードするDNAは、ヒトグリオーマU251細胞から抽出したRNAを鋳型として、#1191: CCGGAATTCACCATGAACCTTCTGCTGTCT (配列番号: 1)、および#1192: CGCGGATCCTACCGCCTCGGCTTGTCACA (配列番号: 2) のプライマーを用いてRT-PCRで得た。得られたDNA断片をEcoRI/BamHIで切って、pBluescriptSKII+のEcoRI/BamHIサイトへクローニングし、プラスミドを得た。このプラスミドの塩基配列を確認したあと、EcoRI/BamHI断片をきりだし、pCAcc (図1) のEcoRI/BglIIIへクローニングし、pCAhVEGF (図2) を得た。対照ベクターpCAcc (Yoshidaら、1997) は、以前に報告されたpCAGGS (Niwaら、1991) に由来する。

(2) アンジオポエチン1 (GenBankのHSU83508(U83508)) をコードするDNAは、ヒト骨髓細胞 (骨髓穿刺して得た細胞のうち、ディッシュに付着する細胞、いわゆる骨髓ストローマ細胞) から抽出したRNAを鋳型として、#1435: GAAGATCTATGACA

GTTTCCTTTCTTTG（配列番号：3）、および#1436：GAAGATCTCAAAAATCTAAAGGTCG AATCA（配列番号：4）のプライマーを用いてRT-PCRで得た。得られたDNA断片を BglIIで切断して、pBluescriptSKII+のBglIIサイトへクローニングし、プラスミドを得た。このプラスミドの塩基配列を確認したあと、BglII断片をきりだし、pCACC（図1）のBglIIサイトへクローニングし、pCacchAngla（図3）を得た。クローニングしたDNA断片の塩基配列を配列番号：5示す。

また、pCacchAnglaのアンギオポエチンcDNA断片を鋳型にして、#1641：GGGAAT TCACCATGACAGTTTCTTTCTTTGCTTTC（配列番号：6）、および#1638：AGCTCCTGG ATTATATATGTTTGACG（配列番号：7）のプライマーを用いてPCRを行なった。これで得られた断片をEcoRIで切って、pCacchAnglaのEcoRI断片と入れ替えた。これによりコザックコンセンサス配列を持つヒトアンギオポエチンcDNAを発現するpCacchAnglを得た。クローニングしたDNA断片の塩基配列を配列番号：8示す。

〔実施例2〕 動物モデル

New Zealand white rabbit (male, 3.0-3.5kg)を使用した。ケタラルール（三共）3ml+キシラジン（第一製薬）1mlによる麻酔導入後、左大腿部鼠径靱帯より膝にかけて皮切をおき大腿動脈を露出した。分枝を全て結紮切離し大腿動脈を切除した。これを10日おいたものを慢性下肢虚血モデル、すなわちウサギ下肢虚血モデル（Takeshita, S. J. Clin. Invest., Vol 93, 662-670, 1994）とした。比較検討は3群について行われモデル作成日（OPE day）の10日後（Day 10）、もしくは10日後（Day 10）と15日後（Day 15）にプラスミドの筋肉内投与を行った。投与方法は各々のプラスミド500ugをPBS 2.5mlに溶解し虚血側の大腿内側に小切開をおき内側広筋、内転筋、半膜様腱筋（内側広筋に2ヶ所、内転筋に2ヶ所、半膜様筋に1ヶ所）に直接注入した。27G針によって一ヶ所に500ul、計5箇所にくっきりとおこなった。

動物モデルをプラスミドの投与スケジュール（図4）に従って以下の6群に分

けた。

1. 対照ウサギ（C群）、Day 10にプラセボ（pCAcc）を500 μ g投与（n=8）。
2. VEGF単独（V群）、Day 10にVEGFを500 μ g投与（n=10）。
3. Ang1単独（A群）、Day 10にAng1を500 μ g投与（n=7）。
4. A+V群、Day 10にAng1とVEGFの両方をそれぞれ500 μ g投与（n=7）。
5. A-V群、Day 10にAng1を500 μ g投与した後、Day 15にVEGFを500 μ g投与（n=10）。
6. V-A群、Day 10にVEGFを500 μ g投与した後、Day 15にAng1を500 μ g投与（n=7）。

【実施例3】 浮腫評価

VEGFの主な副作用の一つである浮腫を陰嚢面積（Scrotum size）、下肢周径を測定することにより評価した。患側陰嚢をDay 10, 15, 20, 40にデジタルカメラにて撮影しDay 10の面積を100%としその変化をみた。下肢周径も同様に患側膝下の周径をDay 10, 15, 20, 40に測定しその変化をみた。

VEGF単独投与による浮腫の代表的所見を図5に示すが、これには静脈拡張を伴う陰嚢面積の増加が認められる。プラスミドDNAを投与したすべての群で、陰嚢浮腫は壊死などの炎症性変化の後に起こったものではなかった。Day 10にプラスミドDNAの筋肉内注射を行う前の平均陰嚢サイズは $7.14 \pm 1.06 \text{ cm}^2$ であり、Day 10の値と比較した陰嚢サイズの変化率を表1に示した。

【表1】

	陰嚢サイズ (%)			
	10日	15日	20日	40日
対照	100	101.6±2.7	101.5 ± 4.1	103.3±2.8
V群	100	140.1±11.1 ^b	111.2 ± 5.8	107.7±1.8
A群	100	94.6±1.5	98.4 ± 3.3	98.0±5.5
A+V群	100	115.5±6.1	107.1 ± 4.0	97.6±5.1
V-A群	100	117.9±4.4 ^a	110.8 ± 7.5	118.4±8.6
A-V群	100	98.4±2.0	94.5 ± 3.7	94.4±5.1

^ap<0.05 (対照群との比較)、^bp<0.01 (対照群との比較) である。

Day 15には、V群 (140.1±11.1%、^ap<0.01) およびV-A群 (117.9±4.4%、^ap<0.05) で、C群 (101.6±2.7%) に比べて浮腫の統計学的に有意な増加が認められた。V群とV-A群では浮腫サイズの増加がDay 20, 40にも続いていたが、これらの増加の有意性は境界域であった。この実験でA-V群には試験期間を通じて陰嚢サイズの増加は認められなかった。以上の結果は、V群およびV-A群では遺伝子注入後10日間という短い期間にわたって全身浮腫が生じたことを示している。これに対して、アンジオポエチン-1を前投与するとVEGFによって誘導される全身浮腫が予防されたように思われる。さらに、後肢下部における局所浮腫の指標として後肢周囲長の変化も評価した。A-V群には限局性浮腫の増加は認められなかったが、V群、A+V群およびV-A群ではC群と比較して限局性浮腫の増加が認められた。

[実施例4] 新生血管密度測定

Day 10, 40に患側のAlkaline Phosphatase染色による内腸骨動脈血管造影を施行、血管新生の評価をAngiographic score (AG-score)として評価した。血管造影は麻酔導入後、右内頸動脈より2.7 Frのインフュージョンカテーテルを挿入し患側の内腸骨動脈に選択的に挿入した。ニトロール0.25mg注入の後、造影剤3ml (造影剤3mlを5秒間で注入) による血管造影を行った。AG scoreは大腿部に5mm

1 2

四方のグリッドを5mm間隔に置いて血管がグリッド内にある場合1とし、なければ0とした。AG scoreは血管があるグリッドの総数/グリッド総数とした。

Day 10には、C群、V群、A群、A+V群、A-V群およびV-A群の間にAG scoreの差はなかった（それぞれ 0.08 ± 0.02 、 0.11 ± 0.02 、 0.07 ± 0.04 、 0.08 ± 0.03 、 0.07 ± 0.02 および 0.08 ± 0.02 ）。しかしDay 40には、V群、A群およびA-V群のAG scoreは対照群よりも高かった（C群： 0.29 ± 0.05 、V群： 0.64 ± 0.05^a 、A群： 0.52 ± 0.03^a 、A-V群： 0.58 ± 0.02^a ； $^a p < 0.01$ ）（表2）。5つの投与群の間に有意差は認められなかった。図6に示した代表的な血管造影所見は、この6群における大腿内側での新生血管形成の差を数および内径に関して示している。実際に、尾部腎動脈の近位側の内径に関してはA-V群の方が対照群よりも大きかった（C群： $0.77 \pm 0.02\text{mm}$ 、A-V群： $1.01 \pm 0.03\text{mm}^a$ ； $^a p < 0.01$ ）（表2）。さらに、A-V群の血管内腔はV群（ $0.76 \pm 0.05\text{mm}$ ）に比べて大きく（ $p < 0.01$ ）、アンジオポエチン-1の前投与がより太い血管の形成をもたらした可能性が示唆された。また、V群では血管形成数が多い傾向が認められ、A-V群では大腿中部に形成された血管内径が太い傾向が認められた。

【表2】

	AGスコア	動脈径 (mm)
対照	0.29 ± 0.05	0.77 ± 0.02
V群	0.64 ± 0.05^a	0.76 ± 0.05
A群	0.52 ± 0.03^a	0.85 ± 0.08
A+V群	0.49 ± 0.06	0.90 ± 0.05
V-A群	0.50 ± 0.07	0.90 ± 0.04
A-V群	0.58 ± 0.02^a	$1.01 \pm 0.03^{a, b}$

AG scoreは、血管造影scoreを示す。 $^a p < 0.01$ （対照群との比較）、 $^b p < 0.01$ （V群との比較）である。

【実施例5】 血圧比測定

Day 10, 40に施行。両側後頸骨動脈をドップラーによって探し、血圧を測定。患側圧／健側圧をBPR (Blood Pressure Ratio)とし体循環の指標とした。

血行動態の改善は、選択的血管造影、腓腹部血圧 (CBP) および安静時血流 (RBF) により、Day 10, 40に評価した。具体的には、以前の記載の通りに (Takeshitaら、1994)、血圧計に接続したドップラー流量計 (Datascope、Montvale、NJ) とカフを用いて、Day 10, 40に各モデルの両側後肢で腓腹部体血圧 (CBP) を測定した。各モデルに対して、虚血肢／正常肢の収縮期CBPの比としてCBP比を評価した。

プラスミドDNAの筋肉内注射 (Day 10) の前には全群間にCBP比の差はなく、重症虚血が術側後肢に生じたことが示された。しかしDay 40のCBP比は、A-V群 ($86.0 \pm 8.1\%$ 、 $^*p < 0.01$) がC群 ($51.7 \pm 6.9\%$) よりも有意に高かった (表3)。

局所組織における血液灌流の改善に関する評価も行った。具体的には、内転筋である大内側筋および半膜様筋に経皮的プローブ (P-430、LASERFLO BPM²、Vasa medics、St. Paul、Minnesota) を装着することにより、Day 10, 40に虚血肢の安静時血流 (RBF) を調べた。虚血肢のRBFは上記の領域の4箇所での平均ピーク速度と定義し、RBF比はDay 40のRBFをDay 10の値で割ったものと定義した。Day 10には術側肢のRBFに関して6群間に差はみられなかった。Day 40の血流予備能の変化を表3に示す。Day 40のRBFとDay 10のRBFとの比の算出値から、A-V群 ($234.8 \pm 12.5\%$ 、 $^*p < 0.01$) ではC群 ($139.6 \pm 10.4\%$) に比べて有意な改善が認められたが、他の群における血液灌流の程度はA-V群よりも低かった。

【表3】

	CBP比 (%)	局所RBF比 (%)
対照	51.7 ± 6.9	139.6 ± 10.4
V群	68.4 ± 5.6	187.6 ± 24.5
A群	67.6 ± 5.7	207.8 ± 20.5
A+V群	82.7 ± 8.8	193.3 ± 26.6
V-A群	72.4 ± 13.8	169.0 ± 24.2
A-V群	86.0 ± 8.1 ^a	234.8 ± 12.5 ^a

CBP比は腓腹部血圧比を示し、局所RBF比は安静時局所血流比を示す。^ap<0.01（対照群との比較）である。

〔実施例6〕 組織血流測定

組織血流計を用いてDay 10, 40に施行。患側内側広筋2ヶ所、内転筋2ヶ所の組織血流を測定し合計値をDay 10を100%とし評価した(BPM2)。BPR、BPM2ではControl群にくらべAng1前投与群で有意に改善がみられた。

〔実施例7〕 VEGF蛋白の測定

VEGFの血清中濃度を、Day 0, 10, 15, 20, 40に固相酵素免疫アッセイ(ELISA)ヒトVEGFイムノアッセイキット(Techno Corp., Minneapolis, MN)を用いて測定した。本アッセイの感度は9.0pg/mLであった。いずれの群でもVEGFの蛋白レベルは中程度に過ぎず、Day 15にはすべての実験群で高くても10~30pg/mLであった。

〔実施例8〕 組織学的評価

Day 40に、組織分析のために虚血肢から内転筋のブロック試料を2つ採取した。1つの試料は毛細血管密度の測定用のアルカリホスファターゼ染色のため、OCTコンパウンド中に包埋した後に液体窒素中で急速凍結し、もう1つの試料は細胞

脈密度の測定用の平滑筋細胞 α -アクチン染色のため、ホルマリン中で48時間浸漬固定を行った後にパラフィン包埋を行った。クリオスタットで多数の凍結切片を作製し (10 μ m厚)、以前の記載の通りに (Ziadaら、1984)、毛細血管内皮細胞を検出する目的でインドキシルーテトラゾリウム法を用いてアルカリホスファターゼ染色を行った。毛細血管密度は1mm²当たりの平均毛細血管数と定義した。免疫組織化学に関しては、平滑筋 α -アクチン抗体 (1A4、Dako Japan、Tokyo、Japan) を一次抗体として用いて、ビオチン化抗マウス血清とペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを用いるHISTFINE SAB-PO Kit (Nichirei、Tokyo、Japan) によって検出した。細動脈を同定して毛細血管や細静脈と区別する目的で、3つの異なる切片から15の異なる顕微鏡視野を選択し、陽性平滑筋細胞を同じやり方で算定した。細動脈密度は視野1つ当たりの平均細動脈数として表した。

毛細血管 (直径10 μ m未満) レベルの新生血管形成として毛細血管密度 (毛細血管数/mm²) を評価した。この密度はA-V群が高かった (C群: 169.9 \pm 8.5、A-V群: 273.2 \pm 25.8^a、^ap<0.01、C群との比較) (表4)。アルカリホスファターゼ染色切片の代表的な顕微鏡写真を図7に示す。血管中膜での α -アクチンの免疫組織化学染色により、血管新生の後期に生じる、直径10~50 μ mの範囲の明確な血管である細動脈レベルの新生血管形成が認められた。A+V群およびA-V群における細動脈密度 (細動脈数/視野) は対照群よりも有意に高かった (C群: 4.8 \pm 0.5、A+V群: 10.4 \pm 1.7^a、A-V群: 12.4 \pm 1.4^a、^ap<0.01) が、V群 (6.1 \pm 0.8) およびA群 (6.3 \pm 1.3) における増加の有意性は境界域であった (表4)。さらに、A-V群における増加はV群 (^bp<0.01) およびA群 (^ap<0.01) よりも大きかった。 α -アクチン染色切片の代表的な顕微鏡写真も図8に示している。アルカリホスファターゼ染色および平滑筋細胞 α -アクチン染色を用いた以上の定量分析から、サイトカインの併用、特にアンジオポエチン-1の前投与により、単独投与スケジュールよりも多くの機能的な血管の形成が得られたことが示された。

【表4】

	毛細血管密度 (毛細血管数/mm ²)	動脈密度 (細動脈数/視野)
対照	169.9 ± 8.5	4.8 ± 0.5
V群	228.0 ± 3.2	6.1 ± 0.8
A群	237.2 ± 16.6	6.3 ± 1.3
A+V群	242.7 ± 22.8	10.4 ± 1.7 ^a
V-A群	234.6 ± 13.1	8.6 ± 0.9
A-V群	273.2 ± 25.8 ^a	12.4 ± 1.4 ^{a, b, c}

^ap<0.01 (対照群との比較)、^bp<0.01 (V群との比較)、^cp<0.01 (A群との比較)である。

治療的血管新生では、虚血病変に十分な血流を供給するために機能的な血管の生成が必要である。しかし、いくつかの研究により、臨床試験で広く用いられているVEGFを、機能的血管新生を促進するために単独で用いた場合の価値は明確でないことが示されている。

この点の考察に関しては2つの理由が考えられる。第一に、狭窄や閉塞は主動脈で生じて末梢虚血の誘因となり、転写因子である低酸素誘導因子-1 (HIF-1) の発現および活性化を招く。HIF-1の発現は、一酸化窒素合成酵素およびVEGFなどをコードするものをはじめとする多くの血管新生性遺伝子の転写増加を招き、血管新生カスケードが進行する (Royenら、2001)。VEGF遺伝子産物のみの投与によって機能的な血管形成が実現するか否かははっきりしていない。最近のある研究は、VEGFは毛細血管の出芽を刺激するように思われるが、この反応は側副流の有意な改善にはつながらないと言及している (Hersheyら、2001)。さらに、ウサギ後肢虚血における虚血病変のHIF-1 α /VP16投与による改善を検討したある研究では、VEGF遺伝子のみの投与よりも改善効果が大きかったことが示されている (Vincentら、2000)。第二に、虚血性疾患の治療にVEGF遺伝子を用いた多くの臨床試験の評価がなされ、好ましい結果が報告されているものの、有意な改善が示されなかった研究もいくつかある (Rajagopalanら、2001)。実際に本実

施例では、VEGF単独投与は毛細血管数の増加を誘導したが、血行動態は改善されず、血管成熟も媒介されないことが示された。以上の研究を蓄積した結果として、この治療によって臨床的に有益な血管新生または動脈新生が得られるのであれば、増殖因子併用療法またはマスタースイッチ遺伝子の理解をさらに深めることが必要である（Blauら、2001；Carmeliet、2000；Simonsら、2000）。

本実施例では、Ang1の前投与が、Ang1やVEGFの単独投与または他の投与スケジュールよりも、血行動態、血管新生後期における血管成熟、および血漿漏出に対する血管保護を改善する効果が大きいことが示された。本発明者等のデータから、Ang1の前投与による刺激によって血管新生が早期、後期ともに促進されて血管成熟をもたらし、それが血行動態と血管保護の改善の原因となったという可能性が示唆される。

このモデルでAng1の前投与が早期、後期ともに血管新生の促進をもたらした機序としては2つが考えられる。第一に、外因性Ang1遺伝子によって生じた流血中の内皮前駆細胞（CEP）がVEGF誘発性血管新生を増強する可能性がある。CEPは出生後の血管新生の原因となり（Asaharaら、1999）、最近の1件の研究ではAng1遺伝子の投与がVEGF投与に比べてCEPの移動を延長したことが報告されている（Hattoriら、2001）。アデノウイルスベクターによるマウスでのVEGF165の過剰発現はCEPの末梢血液への移動を引き起こし、これはDay 2にピークを迎え、Day 14までには対照レベルに回復した。これに対して、Ang1の過剰発現はCEPレベルの上昇をもたらし、そのピークはDay 7～14にあり、Day 28までに対照レベルに回復した。したがって、VEGF遺伝子とAng1遺伝子の併用療法によって得られる血管新生の効果は、これらの2つの遺伝子の投与によって生じるCEP移動の各ピークが同じ時期に起こることから、Ang1を前投与した場合に高くなると考えられる。さらに、Yamashitaらは、ECと壁細胞（周皮細胞および血管平滑筋細胞）が共通の前駆細胞に由来する可能性があることを示した（Yamashitaら、2000）。彼らはVEGFはECの分化には必要であるが、壁細胞の分化は外因性増殖因子とは独立して起

こりうると結論している（Yamashitaら、2000）。したがって、Day 15まで外因性VEGFがない状態でAng1遺伝子の前投与を行うことにより、CEPおよび流血中壁前駆細胞（CMP）から構成される流血中前駆細胞（CP）の移動を促進することが可能と考えられる。Ang1前投与スケジュールにおけるCP集団のCMP比は、VEGF投与（CEPを増加させる）の時期が他の併用よりも遅く、より多くの成熟血管の生成をもたらすため、他の投与スケジュールによるものに比べて高いと思われる。第二に、Ang1遺伝子の前投与に続いてVEGF遺伝子を投与することにより、重要な血管新生誘発因子であるAng2の明らかな遺伝子スイッチングが刺激され、新生血管形成が増強される可能性がある。Ang2の発現は成体の血管新生に必要であり、この因子は血管新生部位で初期に役割を果たす（Malsonpierreら、1997）。また、Mandriotaらは、Ang2 mRNAレベルがVEGF投与によって上昇し、Ang1投与によって低下することを示している（Mandriotaら、1998）。以上の所見を総合すると、Ang1遺伝子前投与スケジュールでは、他の併用スケジュールよりも明瞭に内因性Ang2への血管新生性スイッチングが起これ、Ang2の発現によって血管新生がより長期的に促進される可能性が示唆される。同時投与スケジュールにおけるAng2の発現は、VEGFとAng1がこの遺伝子の発現に相反する影響を及ぼすため、より低いと考えられる。また、後投与スケジュールでは、Ang1の投与がDay 15となるため、Ang2の発現期間は前投与の場合よりも短いと考えられる。

本発明者等は陰嚢サイズを用いてVEGF誘発性浮腫を評価した。ウサギの陰嚢は体幹から隔たっていて組織支持が弱く、結合組織間隙が大きいため血管外浸出液の蓄積が起これやすいことから、陰嚢サイズの変化率は浮腫を評価する感度が高い。本実施例では、浮腫を予防したのは前投与スケジュールのみであった。Ang1は内皮細胞の周囲のマトリックスおよび細胞との強固な接着を促進し、種々の刺激によって生じる血管透過性の予防をもたらしたと思われる（Thurstonら、1999）。Ang1が接着を誘導する分子機構に関してはさらに解明を要するが、Ang1はインテグリンを介して細胞接着を直接支持しうることが最近の研究で示されてい

る (Carlsonら、2001)。Thurstonらは、アデノウイルスベクターによるラットへのAng1遺伝子導入から48時間以内に血管漏出に対する抵抗性が生じ、これは同じモデルで7日後にVEGFを注入して確認されたと報告している (Thurstonら、2000)。実際に、本発明者等の所見は、VEGFによって誘導される血管透過性を前投与スケジュールが阻止したことを示している。これに対して、他の投与スケジュールでは、Ang1によって誘導される透過抵抗性が生じてVEGFによる血管透過性を予防するだけの時間がないために、浮腫が生じた。

以上をまとめると、VEGFとAng1の3種類の併用スケジュールのうち、虚血病変で効果的な改善を示したのはAng1遺伝子の前投与スケジュールのみであった。本実施例では、Ang1遺伝子の前投与によって、虚血肢の血圧の有意な上昇、虚血病変における血流の改善、成熟血管の形成、さらに浮腫の予防がもたらされた。このため、Ang1遺伝子投与による準備刺激は、VEGF遺伝子療法における治療的血管新生に有用と思われる。

産業上の利用の可能性

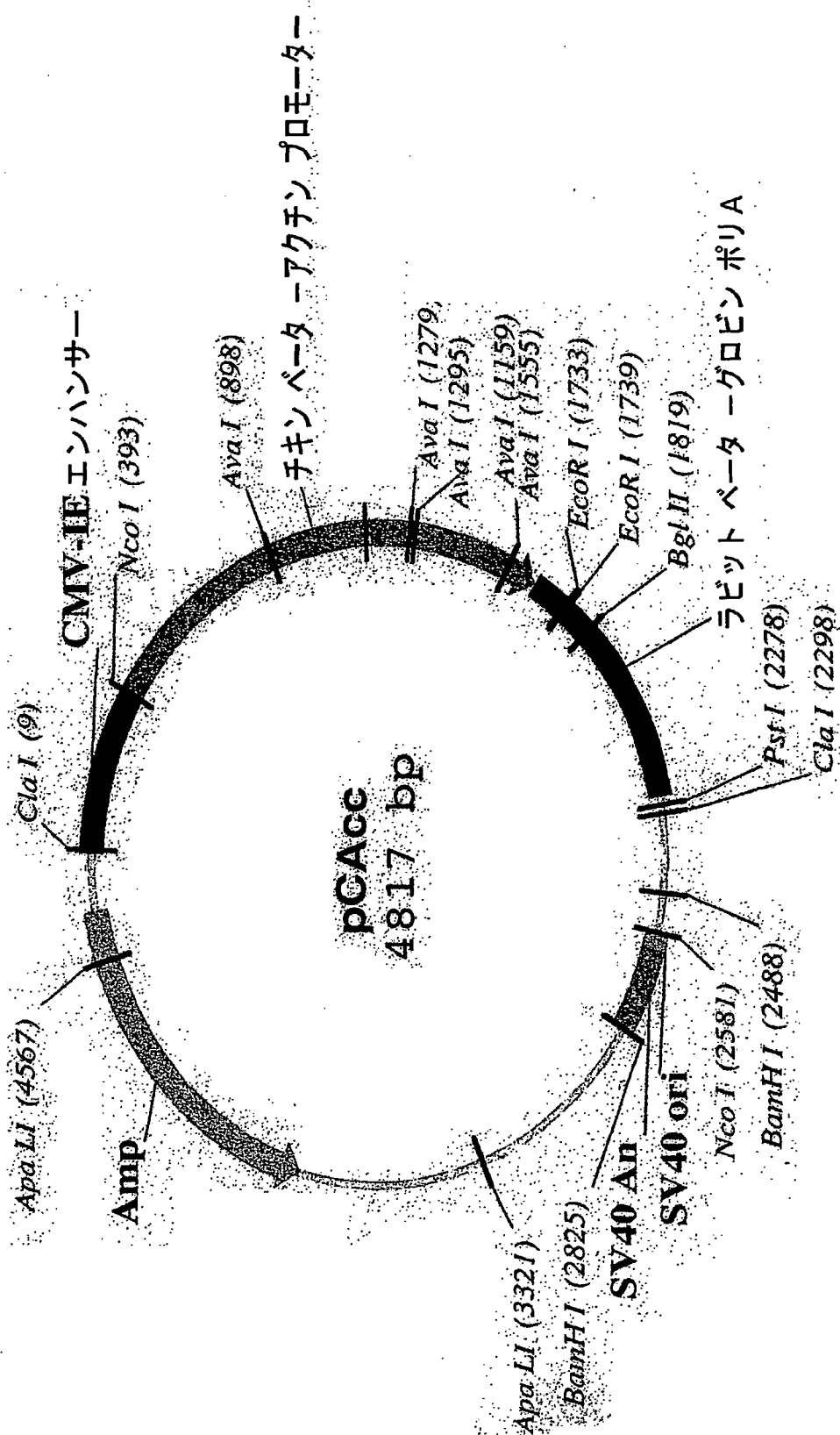
本発明によって、アンギオポエチンをVEGFの前に投与することにより、浮腫の副作用が起こらず、高い血管新生誘導効果が得られる方法が提供された。このことから、VEGF単独投与による血管新生治療の欠点である血管透過性の亢進を防止できる遺伝子治療が可能となった。

請求の範囲

1. アンギオポエチンをコードするベクターまたはアンギオポエチンを血管新生遺伝子をコードするベクターまたは血管新生遺伝子がコードする蛋白投与前に投与処置することを特徴とした局所投与治療方法。
2. 局所投与が筋肉内投与である、請求項1に記載の方法。
3. 血管新生遺伝子がVEGF121または165である、請求項1または2に記載の方法。
4. アンギオポエチンがアンギオポエチン1である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

1 / 8

図 1



2 / 8

図 2

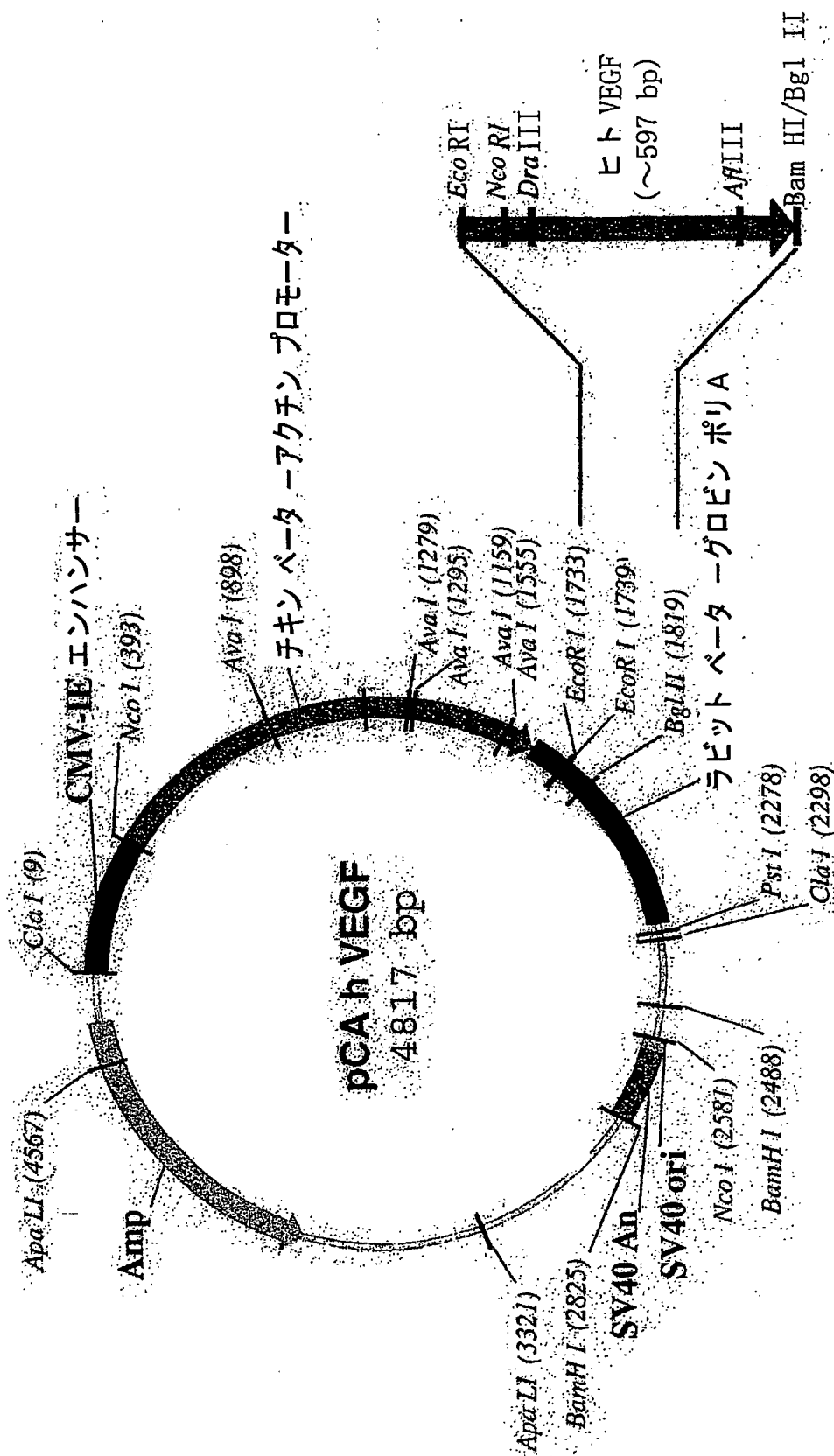


図 3

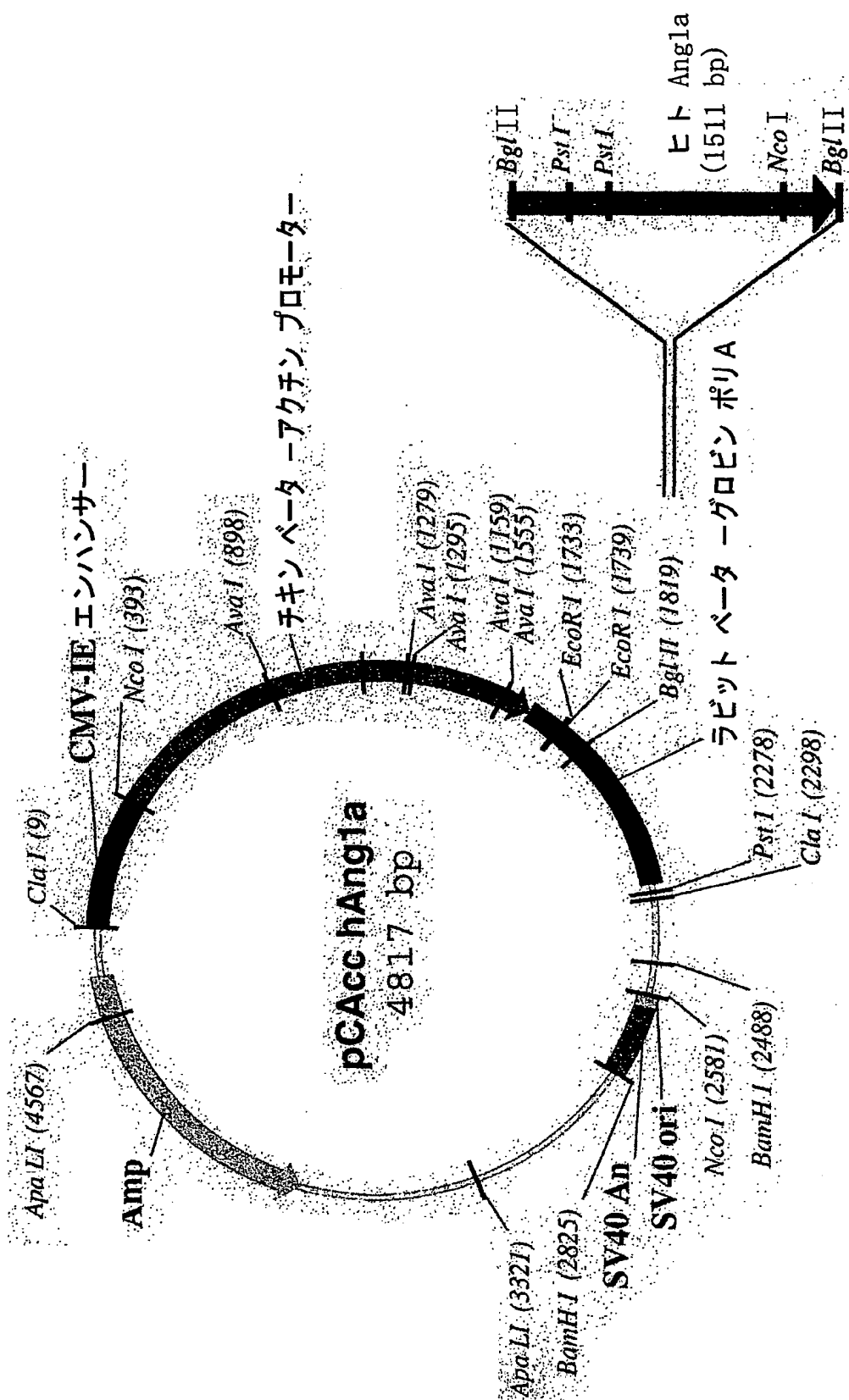
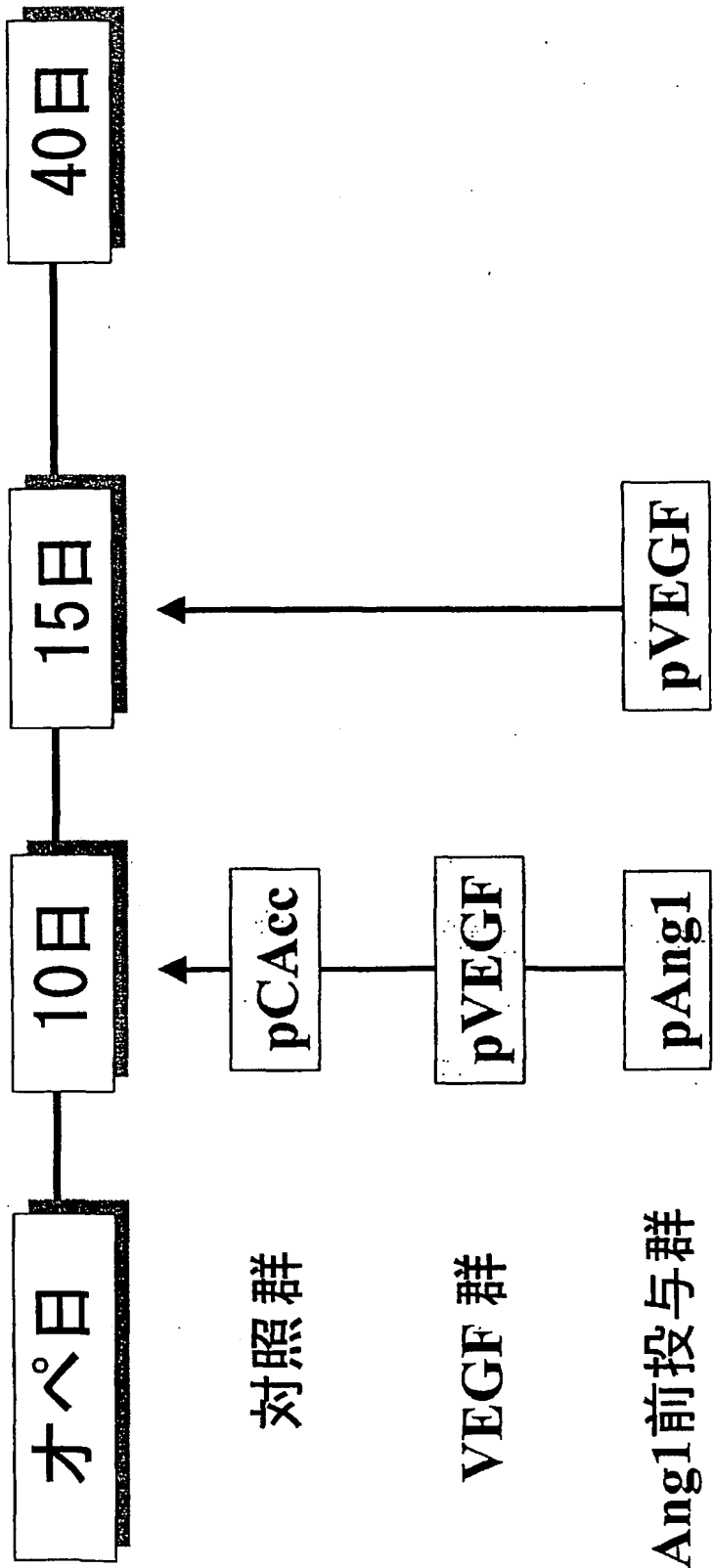
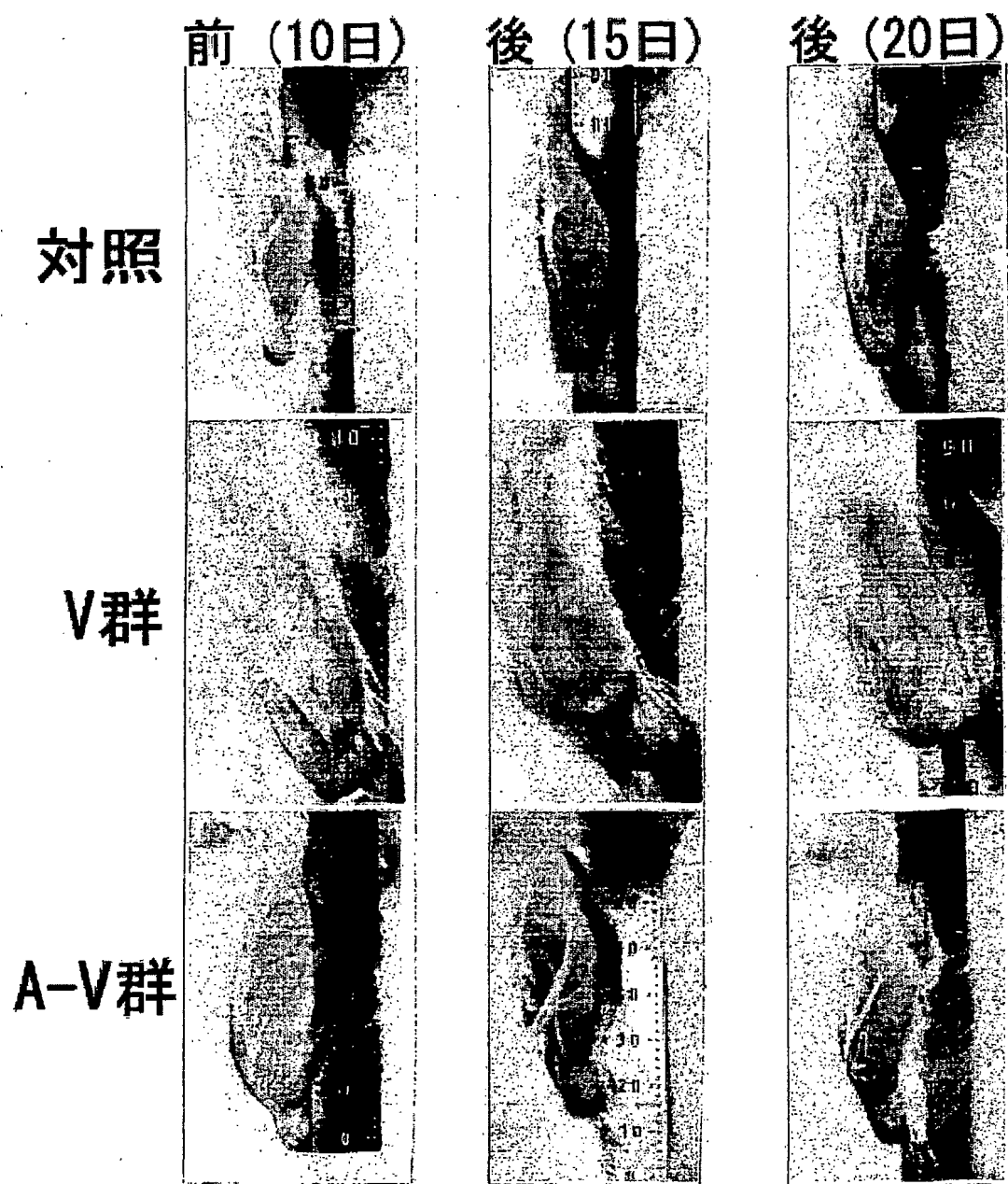


図 4



5 / 8

図 5



6 / 8

図 6

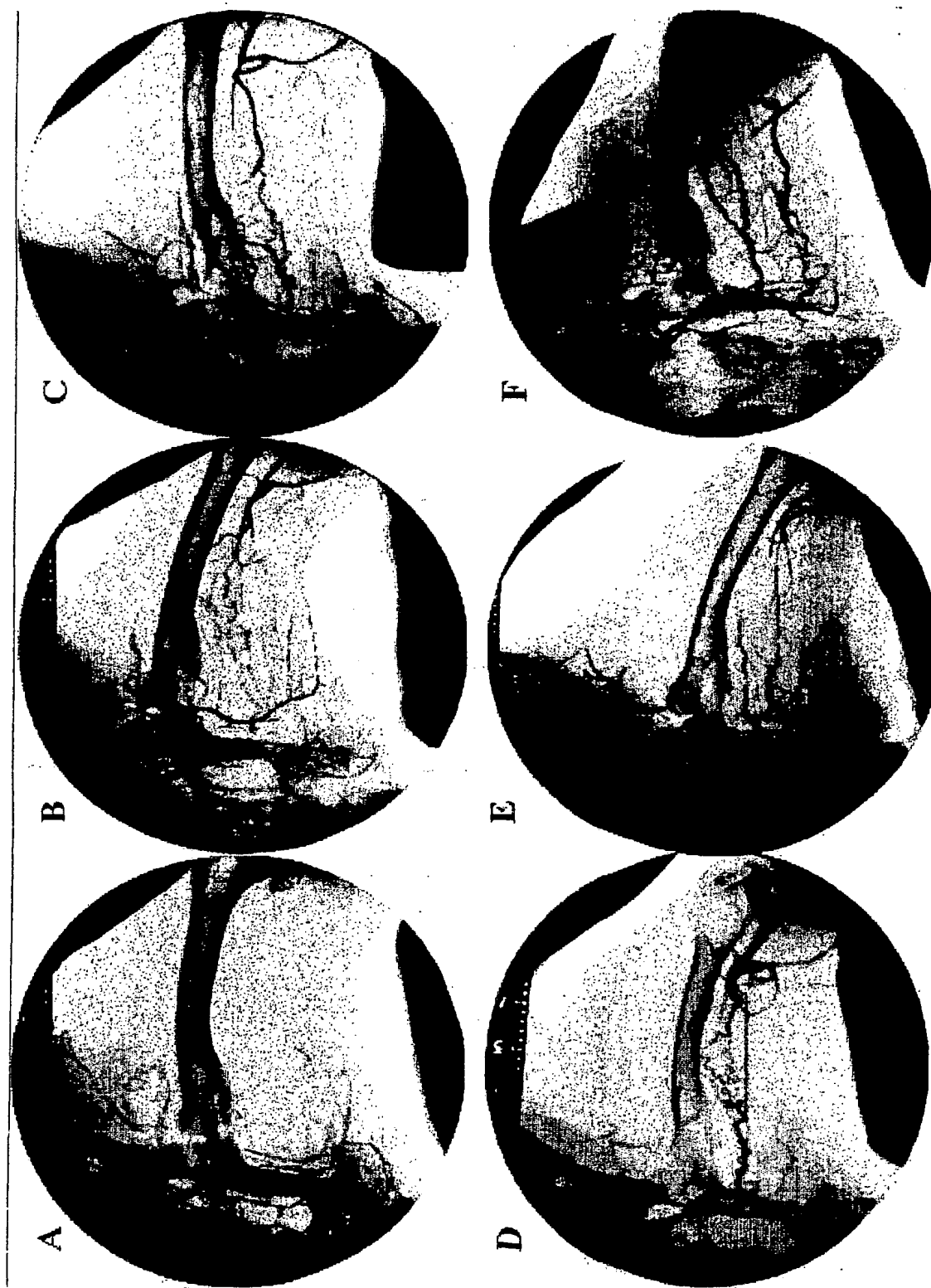


図 7

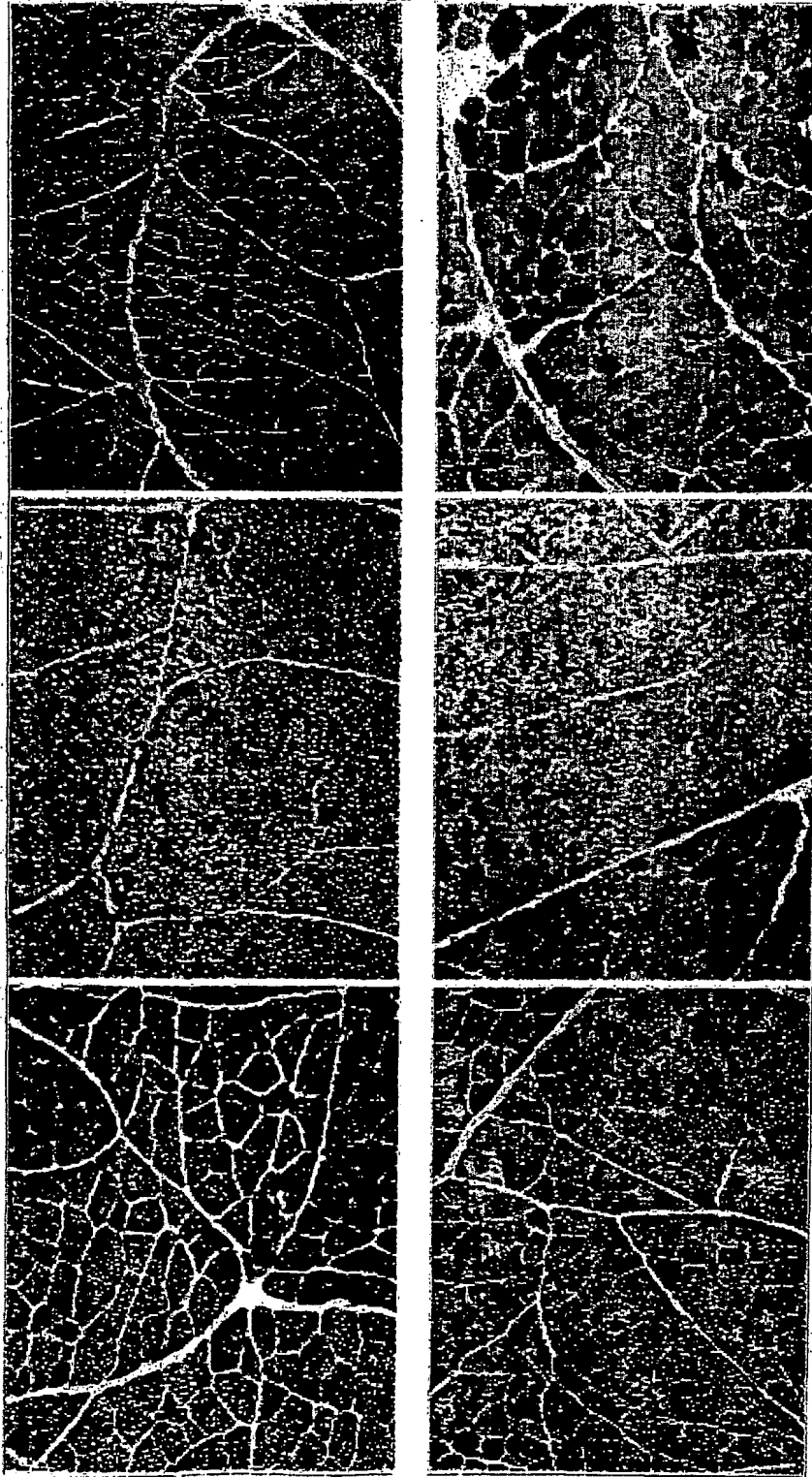
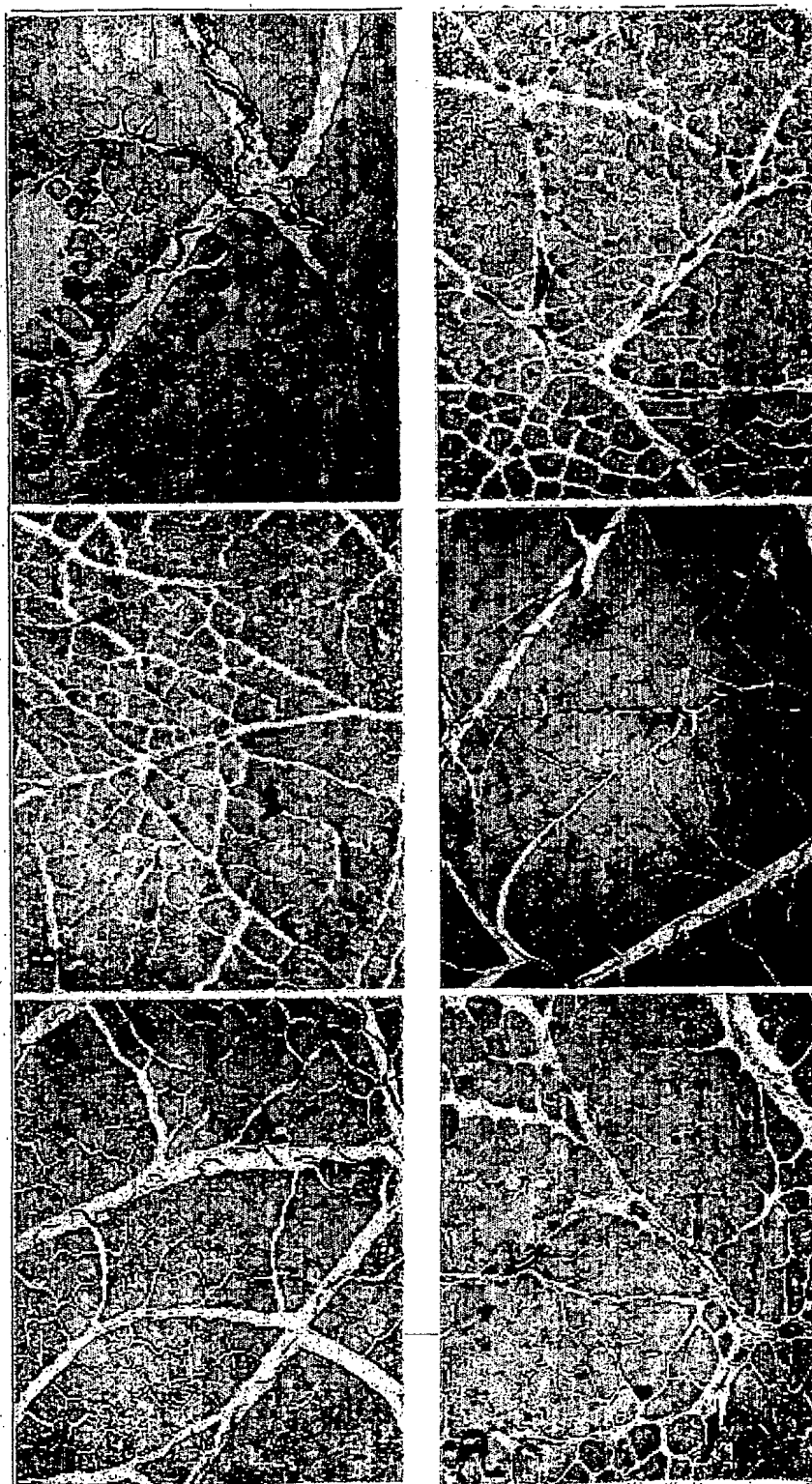


図 8



1 / 7

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> The method of vascular regeneration therapy

<130> D3-A0104P

<140>

<141>

<150> JP 2001-174919

<151> 2001-06-08

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

2 / 7

<400> 1

ccggaattca ccatgaactt tctgctgtct

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

cgcggatcct caccgcctcg gcttgtcaca

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

3 / 7

<400> 3

gaagatctat gacagttttc ctltcctttg

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

gaagatctca aaaatctaaa ggtcgaatca

30

<210> 5

<211> 1508

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

agatctatga cagttttcct ttcttttget ttctctgctg ccattctgac tcacataggg 60
tgcagcaatc agcgccgaag tccagaaaac agtgggagaa gatataaccg gattcaacat 120

4 / 7

gggcaatgig cctacacitt cattcticca gaacacgatg gcaactgtcg tgagagtacg 180
acagaccagt acaacacaaa cgctctgcag agagaigctc cacacgtgga accggatttc 240
tcttcccaga aacttcaaca tctggaacat gtgatggaaa attatactca gtggctgcaa 300
aaactigaga attacattgt ggaaaacatg aagtcggaga tggcccagat acagcagaat 360
gcagttcaga accacacggc taccatgtcg gagataggaa ccagcctcct ccttcagact 420
gcagagcaga ccagaaagct gacagatgtt gagacccagg tactaaatca aacttctcga 480
cttgagatac agctgcigga gaattcatia tccacctaca agctagagaa gcaacttcti 540
caacagacaa atgaaatctt gaagatccat gaaaaaaca gtttattaga acataaaaic 600
ttagaaatgg aaggaaaaca caaggaagag ttggacacct taaaggaaga gaaagagaac 660
cttcaaggct tggttactcg tcaaacatat ataattcagg agctggaaaa gcaattaaac 720
agagctacca ccaacaacag tgtccttcag aagcagcaac tggagctgat ggacacagtc 780
cacaaccttg tcaatctttg cactaaagaa ggtgttttac taaaggaggg aaaaagagag 840
gaagagaaac catttagaga ctgtgcagat gtatatcaag ctggttttaa taaaagigga 900
atctacacta ttatattaa taataigccg gaacccaaaa aggtgttttg caatatggat 960
gtcaatgggg gaggtlggac tgtaatacaa catcgtgaag atggaagict agatttcaa 1020
agaggctgga aggaatataa aatgggtttt ggaaatccct ccggtgaata ttggctgggg 1080
aatgagtitta tttttgccat taccagtcag aggcagtaca tgctaagaat tgagttaatg 1140
gactgggaag ggaaccgagc ctattcacag tatgacagat tccacatagg aaatgaaaag 1200
caaaactata ggttgtatit aaaaggtcac actgggacag caggaaaaca gacgagcctg 1260
atcttacag gtgtgatit cagactaaa gatgtgata atgacaactg tatgtgcaa 1320
tgtgccctca tgtaacagg aggatgggtg ttgatgtctt gtggccctc caatctaaat 1380
ggaatgttct atactgcggg aaaaacat ggaaactga atgggataaa gtggcactac 1440
ttcaaagggc ccagttactc ctacgttcc acaactatga tgattcgacc tttagatit 1500
tgagatct 1508

5 / 7

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

gggaattcac catgacagtt ttcctttcct ttgctttc

38

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

agctcctgga ttatatatgt ttgacg

26

6 / 7

<210> 8

<211> 1511

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaattcacca tgacagtttt cttttccttt gttttcctcg ctgccattct gactcacata 60
gggtgcagca atcagcgccg aagtccagaa aacagtggga gaagatataa ccggattcaa 120
catgggcaat gtgcctacac ttctattctt ccagaacacg atggcaactg tcgtgagagt 180
acgacagacc agtacaacac aaacgctctg cagagagaig ctccacacgt ggaaccggat 240
ttctcttccc agaaactica acatctggaa catgtgatgg aaaattatac tcagtggctg 300
caaaaacttg agaattacat tgtggaaaac atgaagtcgg agatggccca gatacagcag 360
aatgcagttc agaaccacac ggctaccaatg ctggagatag gaaccagcct cctctctcag 420
actgcagagc agaccagaaa gctgacagat gttgagacc aggtactaaa tcaaacttct 480
cgacttgaga tacagctgct ggagaattca ttatccacct acaagctaga gaagcaactt 540
cttcaacaga caaatgaaat cttgaagatc catgaaaaaa acagtttatt agaacataaa 600
atcttagaaa tgggaaggaaa acacaaggaa gagttggaca ccttaaagga agagaaagag 660
aaccitcaag gcttgggttac tcgtcaaaca tatataatcc aggagctgga aaagcaaita 720
aacagagcta ccaccaacaa cagtgtcctt cagaagcagc aactggagct gatggacaca 780
gtccacaacc ttgtcaatct ttgcactaaa gaaggigtgt tactaaaggg aggaaaaaga 840
gaggaagaga aaccatttag agactgtgca gatgtatatac aagctgggtt taataaaaagt 900
ggaaictaca ctatttatac taataataig ccggaacca aaaagggtgt ttgcaatatg 960
gatgtcaatg ggggaggttg gactgtaata caacatcgtg aagatggaag tctagatttc 1020
caaagaggct ggaaggaata taaaatgggt ttggaaatc cctccgtga atattggctg 1080
gggaatgagt ttatttttgc cattaccagt cagaggcagt acatgctaag aattgagtta 1140
atggactggg aagggaaccg agcctattca cagtatgaca gattccacat aggaaatgaa 1200

7 / 7

aagcaaaact ataggttgta tttaaaaggt cacactggga cagcaggaaa acagagcagc 1260
ctgatcttac acggtgctga ttccagcact aaagatgctg ataatgacaa ctgtatgtgc 1320
aaatgtgccc tcatgttaac aggaggatgg tggtttgatg ctgtggccc ctccaatcta 1380
aatggaatgt tctatactgc gggacaaaac catggaaaac tgaatgggat aaagtggcac 1440
tacttcaaag ggcccagta ctccttacgt tccacaacta tgaatgattcg acctttagat 1500
ttttgagatc t 1511

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT (PCT Article 17(2)(a), Rules 13ter.1(c) and 39)

Applicant's or agent's file reference D3-A0104P	IMPORTANT DECLARATION	Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 17 September, 2002 (17.09.02)
International application No. PCT/JP02/05485	International filing date (<i>day/month/year</i>) 04 June, 2002 (04.06.02)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 08 June, 2001 (08.06.01)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC Int.Cl ⁷ A61K48/00, 38/00, 45/00, A61P43/00//A61K38/18		
Applicant DNAVEC Research Inc.		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below.

1. ☒ The subject matter of the international application relates to:
 - a. ☐ scientific theories.
 - b. ☐ mathematical theories.
 - c. ☐ plant varieties.
 - d. ☐ animal varieties.
 - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
 - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
 - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
 - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
 - i. ☒ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
 - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
 - k. ☐ diagnostic methods practised on the human or animal body.
 - l. ☐ mere presentations of information.
 - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:

☐ the description ☐ the claims ☐ the drawings
3. ☐ The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out :

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.
4. Further comments:

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

DESCRIPTION

VASCULAR REGENERATION THERAPY

5 Technical Field

The present invention relates to gene therapy that induces normal angiogenesis by expressing or administering angiopoietin prior to the expression or the administration of angiogenic genes.

10

Background Art

Recent research for treatment of ischemic diseases has been performed using growth factors that induce angiogenesis. For example, therapeutic effects of fibroblast growth factor 2 (EGF2) (Baffour, R. et al., J. Vasc. Surg. 16 (2): 181-91, 1992) and endothelial cell growth factor (ECGF) (Pu, L. Q. et al., J. Surg. Res. 54 (6): 575-83, 1993) on patients with cardiac infarction and acute limb ischemia have been examined. A recent study has revealed that vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) promotes vasculogenesis in animal models with myocardial ischemia and limb ischemia (Takeshita, S. et al., Circulation 90 (5 Pt 2): II228-34, 1994; and Takeshita, S. et al., J. Clin. Invest. 93 (2): 662-70, 1994).

25 Vascular endothelial growth factor (VEGF) was reported as a vascular endothelial cell specific growth factor or as vascular permeability factor (VPF) in 1989, and currently is classified into VEGF A, B, C, D, and E. VEGF A is further divided into 6 different subtypes, and among the subtypes, soluble VEGF 121 and 165 show especially strong vascular growth activity and are now used clinically. It is reported that their effects extend to vasculogenesis during the embryonic period and are enhanced under a low oxygen environment. Moreover, they are involved in NO synthesis and the migration of vascular endothelial cells and vascular endothelial precursor cells. On the other hand, VEGF overexpression may break a balance of angiogenic signals and form "angioma-like" fragile capillary vessels (Carmeliet, P., Nature Med. 6, 1102-1103 (2000)). VEGF gene transfer to vessel walls *in vivo* may cause significant

neointimal formation via angioma-like endothelial proliferation and induce extravasation of red blood cells (Yonemitsu, Y., et al., Lab. Invest. 75, 313-323(1996)). Similar pathological findings were demonstrated in retrovirus-mediated constitutive overexpression of VEGF in myocardium (Lee, R. J., et al., Circulation 102, 898-901 (2000)).

Acute critical limb ischemia, which results from acute obstruction of the major arteries, is caused mainly by thrombotic obstruction and is an ischemic disease important as a target of angiogenic therapy. Delayed treatment of acute critical limb ischemia is quite unsuccessful, often resulting in limb amputation. Moreover, patients with limb amputation have such poor prognosis that one-year survival rates after surgery are only 50%. To solve this problem, techniques for regenerating blood vessels from embryonic stem cells (VEGF receptor Flk1-positive cells) have been investigated (Yamashita, J et al., Nature 408 (2): 92-96, 2000). Blood vessels are composed of endothelial cells and mural cells (pericytes and vascular smooth muscle cells), and a dynamic balance between angiogenesis and blood vessel regression is maintained *in vivo*. It remains unknown what molecular mechanisms control the complex changes such as sprouting, branching, fusion, and intussusception, and how endothelial cells timely achieve functions such as migration, detachment, and adhesion (Suda Toshio, Jikkenigaku (Experimental medicine), May issue, 19 (7): 826-829 (2001)).

Moreover, clinical trials for human gene therapy using angiogenic growth factors have been undertaken, and studies have proceeded to clinically apply this therapy to angiogenesis for treatment of critical limb ischemia. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF), which are endothelial cell-specific growth factors, are considered as potent therapeutic genes for this purpose. Peripheral vascular diseases, representatives of which include arteriosclerosis obstruction and Burger's disease, show clinical symptoms such as intermittent claudication, resting pain, and tissue damage in the hind limbs (necrosis). Effective treatments are not currently available for patients with resting pain and ischemic ulcer caused by peripheral vascular obstruction. Hind limb

amputation is not avoidable in cases where vascular dilation and recovery of blood circulation by surgery cannot be performed. Under these circumstances, a new therapy comprising the formation of collateral circulation by angiogenic factors - therapeutic angiogenesis has been proposed.

Isner et al. have reported angiogenesis using VEGF gene and have demonstrated relatively promising results by means of plasmid-based gene transfer in human (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998)). Isner et al. began two deferent gene therapy clinical trials: 1) VEGF gene transfer into vessel walls by catheter; and 2) VEGF gene transfer into muscles by injection. Especially, it has been reported that gene transfer using injection showed limb salvage rates of 70 to 80%. Moreover, neither intramuscular nor intravascular gene transfer has shown any toxicity due to immune reaction in clinical trials. More than 100 patients have undergone the treatment and have shown promising results. Related adverse effects and toxicity levels of intramuscular gene transfer of VEGF have been hardly reported at present. However, recent reports indicate that transgenic- (Thurston, G., et al., Science 286, 2511-2514 (1999)) or adenovirus- (Thurston, G., et al., Nature Med. 6, 460-463 (2000)) mediated overexpression of VEGF results in abnormal vasculogenesis in transgene-introduced animals, and that plasmid-based intramuscular VEGF gene transfer showed transient edema in human subjects with ischemic limbs (Baumgartner, I., et al., Circulation 97, 1114-1123 (1998); Isner, J. M., et al., J. Vasc. Surg. 28, 964-973 (1998) Baumgartner, I., et al., Ann Intern Med.; 132, 880-884, (2000)).

No definitive and practical methods are known for ameliorating increased vascular permeability, a drawback in angiogenic therapy by application of VEGF alone.

Disclosure of the Invention

In order to prevent increased vascular permeability, a drawback of angiogenic therapy using administration of VEGF alone in gene therapies or drug treatments, the present invention provides a method of administering angiopoietin prior to VEGF administration, thereby providing results in highly

effective angiogenic induction, without causing the adverse side effects of edema.

Angiopoietin 1 (Ang-1), angiopoietin 2 (Ang-2) and its receptor, Tie-2, are known as regulating factors which specifically interact with vascular endothelial cells, like the VEGF family. Angiopoietins are ligands for the Tie-2 tyrosine kinase receptor, and considered involved in vascular maturation during angiogenesis. Four subtypes are known at present, and subtypes 1 and 2 bind to Tie-2 receptor. Ang-2 is estimated to be an endogenous antagonist of Ang-1 (Saito, T. N; Nature, Vol. 376, 70-74, (1995)). Ang-2 is also known to be induced selectively depending on VEGF function (Oh, H., et al., J. Biol. Chem., 274, 15732-15739 (1999)). The differences between Ang-1 and VEGF are that Ang-1 cannot proliferate vascular endothelial cells, is involved in pericyte junctions, and, unlike VEGF, does not promote vascular permeability. It is known that interaction between endothelial cells and pericytes is important regulatory mechanism in angiogenesis. Pericytes adhere to endothelial cells to thereby function to differentiate endothelial cells and inhibit their proliferation. This mechanism considered to involve TGF- β activation and formation of physical barrier that surround the cells (D'Amore, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 4544-4548 (1989)).

The present inventors studied effects of angiopoietins and reported that pAng-1 improved AG score, blood flow, blood vessel diameter and capillary density when plasmid pAng-1 or pAng-2 was administered in rabbit models (Kou-Gi Shyu, et al., Circulation. 98, 2081-2087 (1998)). Based on this report, the present inventors hypothesized by themselves efficacy for neovascularization by pre-induction of an interaction between pericytes prior to the action of VEGF and conducted experiments to demonstrate the efficacy.

On the other hand, Thurston et al. showed that adenovirus-mediated gene transfer of angiopoietin 1 suppressed the increased permeability induced by VEGF using vascular permeability evaluation models with Evan Blue (Gavin Thurston, Nature Med, Vol. 6, No. 4, 460-463, (2000)). However, another report indicated that co-administration of pAng-1 and pVEGF plasmids to rabbit models showed no difference from

administration of pVEGF plasmid alone (Chase, J. K., Arterio. Thromb. Vasc. Bio. 20, 2573-2578 (2000)).

The present inventors focused on the expression timing of both genes, and developed a local administration schedule of pre-administration of angiopoietin prior to VEGF, which does not cause the adverse side effects of edema and remarkably induces angiogenesis.

The present invention relates to a method of administering angiopoietin prior to VEGF to provide a high angiogenic induction effect without causing the adverse side effects of edema. More specifically, the present invention relates to:

(1) a method of treatment by local administration, said method comprising administering an angiopoietin or a vector encoding an angiopoietin prior to administration of a vector encoding an angiogenic gene or a protein encoded by an angiogenic gene;

(2) the method of (1), wherein said local administration is intramuscular administration;

(3) the method of (1) or (2), wherein said angiogenic gene is VEGF121 or VEGF165; and

(4) the method of any one of (1) to (3), wherein the angiopoietin is angiopoietin 1.

The term "angiogenic gene" used herein indicates a gene that directly or indirectly associated with development, migration, proliferation, and maturation of cells involved in vascular formation.

The present inventors researched extensively for a method of angiogenesis with low vascular permeability, which method comprises injecting Angiopoietin-1 intramuscularly into rabbit ischemic hind limb models, followed by VEGF 165 injection, using relatively safe plasmid vectors, and revealed its therapeutic effect. Target diseases include: 1) peripheral vascular diseases, arteriosclerosis obstruction, and such; 2) heart disorders, angina pectoris, myocardial infarction, and such; 3) nephrosis, nephritis, and such; and 4) pulmonary disorders, nerve disorders, and such, but there is no limitation to the diseases as long as angiogenic induction is effective for the diseases. Treatment targets do not have to be limited to ischemic tissues, but can be tissues that cannot be called

ischemic tissues in the strict sense. Such tissues may be affected by diseases and symptoms that can be effectively treated by generation and reconstruction of functional blood vessels. For example, treatment targets include nephritis, diabetic nephrosis; obstinate ulcers; chronic or acute obstinate infectious diseases such as osteomyelitis; and moya-moya disease and other vascular diseases in the neurosurgery field. Any muscle including skeletal, smooth, and cardiac muscle can be used as administration sites. Administration sites are not limited to muscle, but include skin (epidermis and corium), arteries, veins (including the portal vein), lymph duct, kidney, chorion, periosteum, connective tissues, and bone marrow. Methods to substantially obtain therapeutic effects by local administration include direct administration of vectors or proteins, or administration using carriers and vehicles. Vehicles need to be physiologically acceptable and include organics such as biopolymers, inorganics such as hydroxyapatite, specifically, collagen matrix, polylactate polymer or its copolymer, polyethylene glycol polymer or its copolymer, and their chemical derivatives. Moreover, vehicles may be mixtures of these physiologically acceptable materials. Injection tools include industrial products such as conventional medical syringes or continuous injectors that can be kept inside or outside of the body. There is no limitation to vectors as long as the vectors are physiologically acceptable. Any vectors can be used, including adenovirus vectors, adenovirus-associated vectors, retrovirus vectors, lentivirus vectors, herpes simplex virus vectors, vacciniavirus vectors, Sendai virus vectors, and non-viral vector can be used. Vectors can be used in the form of patient-derived cells treated by the vectors.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the structure of plasmid pCAcc.

Fig. 2 shows the structure of plasmid pCAhVEGF.

Fig. 3 shows the structure of plasmid pCAhAng1.

Fig. 4 shows a protocol for gene transfer into rabbit hind limb ischemic models.

Fig. 5 is a set of photographs showing rabbit scrotum on the ischemic side. These photographs demonstrate that in Group

V, scrotum edema and vain dilatation occurred at Day 15 post-gene administration, but pre-administration of Ang-1 prevented scrotum edema induced by VEGF.

Fig. 6 presents selective internal iliac angiographs at Day 40 of six administration schedule groups: (A), Control; (B), Group V; (C), Group A; (D), Group A+V, (E), Group V-A; and (F), Group A-V.

Fig. 7 is a set of representative photomicrographs showing numerous capillary ECs revealed by alkaline phosphatase stain in ischemic thigh muscle. (A), Control; (B), Group V; (C), Group A; (D), Group A+V; (E), Group V-A; and (F), Group A-V; Bar = 50 μ m. ECs = endothelial cells.

Fig. 8 is a set of representative photomicrographs showing arterioles covered with smooth muscle cells revealed by smooth muscle cell α -actin stain in ischemic thigh muscle. (A), Control; (B), Group V; (C), Group A; (D), Group A+V; (E), Group V-A; and (F), Group A-V; Bar = 50 μ m.

Best Mode for Carrying out the Invention

Herein below, the present invention will be described in detail using examples; however, it is not to be construed as being limited thereto.

Furthermore, the experiments in the examples were performed according to the following references.

1. Satoshi Takeshita, J. Clin. Invest., 1994, 93: 662-670
2. Yukio Tsurumi, Circulation., 1996, 94: 3281-3290
(Established rabbit hind limb model; demonstrated improvement of AG score, BPR, and capillary density by administration of pVEGF in the rabbit hind limb model; and assessed the above mentioned indexes plus improvement in blood flow.)
3. Iris Baumgartner, Ann. Intern. Med., 2000, 132: 880-884
(Actual assessment of edema in hind limbs of 90 patients who received pVEGF.)
4. Kou-Gi Shyu, Circulation., 1998, 98: 2081-2087 (Assessment of improvements of AG score, blood flow, vessel diameter, and capillary density by administration of pAng1, when pAng1 and pAng2 were administered to rabbit models.)
5. Gavin Thurston, Nature Med, 2000, 6 (4) : 460-463.

6. G. Thurston, *Science*, 1999, 286: 2511-2514 (Assessment of improvement in suppressed VEGF-induced vascular permeability in vascular permeability evaluation models that received adenovirus vector-mediated Ang1 transfer)

5 7. Liubov Poliakova, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1999, 118: 339-347. Time course assessment of changes in scrotum size and hind limb circumference in rabbit models which received adenovirus vector-mediated VEGF transfer)

10 Data are shown as mean \pm SEM in the examples of the present invention. Statistic comparison was performed by ANOVA followed by Bonferroni/Dunn test. $p < 0.05$ is considered to be statistically significant.

[Example 1] Plasmids

15 (1) A DNA encoding VEGF was obtained by RT-PCR using RNA extracted from human glioma U251 cells as a template and a set of primers: #1191: (CCGGAATTCACCATGAACTTTCTGCTGTCT/SEQ ID NO: 1) and #1192: (CGCGGATCCTCACCGCCTCGGCTTGTGACA/SEQ ID NO: 2). The amplified fragment was digested with *EcoRI/BamHI* and subcloned
20 into pBluescriptSKII+ at *EcoRI/BamHI* sites. After confirming the nucleotide sequence of the plasmid thus obtained, the plasmid was digested with *EcoRI/BamHI*, and an *EcoRI/BamHI* fragment was subcloned into pCacc (Fig. 1) at *EcoRI/BglIII* sites to obtain pCAhVEGF (Fig. 2). The control vector pCacc (Yoshida
25 et al., 1997) was derived from the previously reported pCAGGS (Niwa et al., 1991).

(2) A DNA encoding Angiopoietin 1 (GenBank: HSU83508 (U83508)) was obtained by RT-PCR using RNA extracted from human bone marrow cells (cells obtained by bone marrow aspiration and
30 having ability to remain attached to dishes, so-called bone marrow stroma cells) as a template and a set of primers: #1435: (GAAGATCTATGACAGTTTTCTTTCCTTTG/SEQ ID NO: 3) and #1436: (GAAGATCTCAAAAATCTAAAGGTCGAATCA/SEQ ID NO: 4). The amplified fragment was digested with *BglIII* and subcloned into
35 pBluescriptSKII+ at a *BglIII* site to obtain the plasmid carrying angiopoietin 1. After confirming the nucleotide sequence, the plasmid was digested with *BglIII* and the isolated *BglIII* fragment was subcloned into pCacc (Fig. 1) at the *BglIII* site to obtain

pCacchAngla (Fig. 3). The nucleotide sequence of the cloned DNA fragment is shown in SEQ ID NO: 5.

Moreover, PCR was performed using Angiopoietin cDNA fragment of pCacchAngla as a template and primer sets #1641: (GGGAATTACCATGACAGTTTTCTTCTTGCTTTC/SEQ ID NO: 6) and #1638: (AGCTCCTGGATTATATATGTTTGACG/SEQ ID NO: 7). The amplified fragment was digested with *EcoRI* and used to replace the *EcoRI* fragment of pCacchAngla to obtain a plasmid expressing human angiopoietin cDNA, pCacchAngl, which contained a Kozak consensus sequence. The sequence of the cloned DNA fragment is shown in SEQ ID NO: 8.

[Example 2] Animal model

New Zealand white rabbits (male, 3.0 to 3.5 kg) were used. After rabbits were anesthetized with a mixture of 3 ml ketaral (Sankyo Co., Ltd.) and 1 ml xylazine (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), the femoral artery was exposed by skin incision between the left femoral inguinal ligament and the knee. All of the artery branches were ligated and excised, the femoral artery was removed, and the animals were kept for 10 days to establish a chronic hind limb ischemia model, that is, a rabbit hind limb ischemia model (Takeshita, S., J. Clin. Invest., 1994, 93: 662-670). A comparative assessment was conducted in three groups. Intramuscular injection of plasmids was performed on the 10th day (Day 10) or on the 10th day (Day 10) and 15th day (Day 15) after the establishment of the model (OPE day). Each plasmid (500 µg) was dissolved in 2.5 ml PBS and directly injected into the medial great muscle (2 sites), adductor muscle (2 sites), and semimembranous muscle (1 site) through the incision created in the medial thigh of the ischemic thigh. Each injection was performed slowly using a 27-gauge needle at 5 sites, 500 µl each.

Animal models were divided into six groups as follows according to administration schedule of plasmids (Fig. 4).

1. Control rabbits (Group C) received 500 µg of placebo (pCacc) on Day 10 (n=8).

2. VEGF alone (Group V) received 500 µg of VEGF on Day 10 (n=10).

3. Ang1 alone (Group A) received 500 µg of Ang1 on Day 10 (n=7).

4. Group A+V received both 500 µg of Ang1 and 500 µg VEGF on Day 10 (n=7).

5. Group A-V received 500 µg of Ang1 on Day 10, followed by administration of 500 µg VEGF on Day 15 (n=10).

6. Group V-A received 500 µg of VEGF on Day 10, followed by administration of 500 µg of Ang-1 on Day 15 (n=7).

10 [Example 3] Assessment of edema

Assessment of edema, the main adverse side effect caused by VEGF, was performed based on measured scrotum size and hind limb circumference. Photographs of the scrotum at the affected site at Day 10, 15, 20, and 40 were taken using a digital camera, and changes were measured by taking the size on Day 10 as 100%. The circumference of the hind limb below the knee was also measured at Day 10, 15, 20, and 40, and the changes in size were evaluated.

Representative findings of edema by administration of VEGF alone are shown in Fig. 5 and revealed an increased area of the scrotum accompanying venous dilatation. In all groups treated with plasmid DNA, scrotum edema was not followed by inflammatory changes such as necrosis. Average scrotum size before the intramuscular injection of plasmid DNA on Day 10 was 7.14 ± 1.06 cm² and percent change of scrotum size compared to that of Day 10 is shown in Table 1.

Table 1

	<i>Scrotum size (%)</i>			
	<i>Day 10</i>	<i>Day 15</i>	<i>Day 20</i>	<i>Day 40</i>
Control	100	101.6±2.7	101.5 ± 4.1	103.3±2.8
Group V	100	140.1±11.1 ^b	111.2 ± 5.8	107.7±1.8
Group A	100	94.6±1.5	98.4 ± 3.3	98.0±5.5
Group A+V	100	115.5±6.1	107.1 ± 4.0	97.6±5.1
Group V-A	100	117.9±4.4 ^a	110.8 ± 7.5	118.4±8.6
Group A-V	100	98.4±2.0	94.5 ± 3.7	94.4±5.1

30 ^ap<0.05 versus control group

^bp<0.01 versus control group

On Day 15, there was a statistically significant increase in edema in Group V ($140.1 \pm 11.1\%$, $^b p < 0.01$) and V-A ($117.9 \pm 4.4\%$, $^a p < 0.05$), compared with Group C ($101.6 \pm 2.7\%$). In Group V and V-A, the size of edema continued to increase on Day 20 and 40, but these increases were of marginal significance. In this experiment, Group A-V did not show any increase of scrotum size throughout study. These results indicate that systemic edema occurred for a short period of 10 days after gene injection in Group V and V-A. In contrast, pre-administration of angiopoietin-1 appeared to prevent the systemic edema induced by VEGF. In addition, the present inventors evaluated hind limb circumference changes as an indicator of local edema in the lower hind limb. Group A-V showed no increased regional edema, whereas an increase of regional edema was noted in Group V, A+V and V-A, compared with Group C.

[Example 4] Angiographic assessment

Internal iliac artery angiography of affected sites stained by alkaline phosphatase was performed at Day 10 and 40, and an angiographic score (AG score) was used to assess angiogenesis. After anesthetization, a 2.7 Fr infusion catheter was inserted from the right medial carotid artery to the internal iliac artery selectively, 0.25 mg nitrol was injected, then angiography was conducted using 3 ml of contrast medium (3 ml contrast medium was infused within 5 seconds). When 5 mm² grids were placed over the thigh area at 5 mm intervals, a grid crossed by arteries was counted as 1 and a grid crossed by no arteries was counted as 0. AG score was defined as the total number of grids crossed by arteries/the total number of grids.

On Day 10, there was no difference in AG scores among Groups C, V, A, A+V, A-V, and V-A (0.08 ± 0.02 , 0.11 ± 0.02 , 0.07 ± 0.04 , 0.08 ± 0.03 , 0.07 ± 0.02 , and 0.08 ± 0.02 , respectively). On Day 40, however, AG scores of Group V, A, and A-V were higher than that of control (Group C: 0.29 ± 0.05 , Group V: 0.64 ± 0.05^a , Group A: 0.52 ± 0.03^a , and Group A-V: 0.58 ± 0.02^a ; $^a p < 0.01$) (Table 2). No significant differences were observed among the five test groups. Representative angiographic findings, shown in Fig. 6, indicate the differences in neovascular formation in the medial

thigh in terms of number and internal luminal diameter among the six groups. In fact, the internal diameter of the proximal side of the caudal gluteal artery showed that Group A-V had larger vessels than control (Group C: 0.77 ± 0.02 mm and Group A-V: 1.01 ± 0.03 mm^a; ^a $p < 0.01$) (Table 2). Moreover, Group A-V demonstrated increased vessel cavity ($p < 0.01$) in comparison with Group V (0.76 ± 0.05 mm), suggesting that the pre-administration of angiopoietin-1 contributed to produce larger vessels. There was also a tendency for the formation of more numerous vessels in the Group V and larger internal diameter vessels of the midhigh zone were formed in the Group A-V.

Table 2

	<i>AG score</i>	<i>Arterial diameter (mm)</i>
Control	0.29 ± 0.05	0.77 ± 0.02
Group V	0.64 ± 0.05^a	0.76 ± 0.05
Group A	0.52 ± 0.03^a	0.85 ± 0.08
Group A+V	0.49 ± 0.06	0.90 ± 0.05
Group V-A	0.50 ± 0.07	0.90 ± 0.04
Group A-V	0.58 ± 0.02^a	$1.01 \pm 0.03^{a,b}$

AG score = Angiographic score

^a $p < 0.01$ versus control group

^b $p < 0.01$ versus Group V

[Example 5] Determination of blood pressure ratio

Measurement was taken on Day 10 and Day 40. Doppler was used to find posterior carotid arteries and measure the blood pressure. Blood Pressure Ratio (BPR) was calculated by the blood pressure of the ischemic site/the blood pressure of the non-ischemic site and used as an indicator of body circulation.

Improvement of hemodynamic state was assessed by selective angiography, calf blood pressure (CBP) and resting blood flow (RBF) on Day 10 and 40. Specifically, as described previously (Takeshita et al., 1994), calf blood pressure (CBP) was measured in both hind limbs of each model on Day 10 and Day 40 using a Doppler flowmeter (Datascope, Montvale, NJ) and the cuff, which was connected to a pressure manometer. The CBP ratio was

defined for each model as the ratio of the ischemic/normal limb systolic CBP.

Before intramuscular injection of plasmid DNA (Day 10), there was no difference in CBP ratio among all groups, showing that severe ischemia occurred in the operative side of the hind limb. On Day 40, however, CBP ratio increased significantly more in Group A-V ($86.0 \pm 8.1\%$, $^a p < 0.01$) than in Group C ($51.7 \pm 6.9\%$) (Table 3).

Assessment concerning the improvement of blood perfusion in local tissues was also performed. Specifically, resting blood flow (RBF) of the ischemic limb was measured by attaching a percutaneous probe (P-430, LASERFLO BPM², Vasamedics, St. Paul, Minnesota) to the adductor, medial large and semi-membranous muscles on Day 10 and Day 40. RBF of the ischemic limb was defined as the average peak velocity of four points in the above areas, and the RBF ratio was calculated by dividing RBF on Day 40 by RBF on Day 10. The RBF of the operative limb on Day 10 was similar among six groups. The changes in flow reserve on Day 40 are shown in Table 3. The calculated ratio of RBF on Day 40 to that on Day 10 indicated that there was significant improvement in Group A-V ($234.8 \pm 12.5\%$, $^a p < 0.01$) compared with Group C ($139.6 \pm 10.4\%$), although a greater degree of blood perfusion was not observed in the other groups.

Table 3

	<i>CBP ratio (%)</i>	<i>Regional RBF ratio (%)</i>
Control	51.7 ± 6.9	139.6 ± 10.4
Group V	68.4 ± 5.6	187.6 ± 24.5
Group A	67.6 ± 5.7	207.8 ± 20.5
Group A+V	82.7 ± 8.8	193.3 ± 26.6
Group V-A	72.4 ± 13.8	169.0 ± 24.2
Group A-V	86.0 ± 8.1^a	234.8 ± 12.5^a

CBP ratio indicates the calf blood pressure ratio and regional RBF ratio indicates regional resting blood flow ratio. $^a p < 0.01$ versus control group

[Example 6] Tissue blood flow measurements

Measurements were taken on Day 10 and Day 40 using a tissue blood flow meter. Tissue blood flow was measured at the ischemic medial great muscle (2 sites) and adductor muscle (2 sites), and total values were assessed by taking the value on Day 10 as 100% (BPM2). BPR and BPM2 showed significant improvement in the Ang-1 pre-administrated group compared with the control group.

[Example 7] VEGF protein measurement

The serum concentration of VEGF in the serum was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Human VEGF immunoassay kit (Techne Corp., Minneapolis, MN) on Day 0, 10, 15, 20 and 40. The sensitivity of this assay was 9.0 pg/mL. In every group, the levels of VEGF protein were only moderate: at most 10 to 30 pg/ml throughout the experiment on Day 15.

[Example 8] Histological assessment

On Day 40, two block-samples of adductor muscle were removed from ischemic limbs for histological analysis. One sample was embedded in OCT compound followed by snap-freezing in liquid nitrogen for alkaline phosphatase stain to determine capillary density. Another was embedded in paraffin after immersion-fixation in formalin for 48 hours for smooth muscle cell α -actin stains to determine arteriole density. Multiple frozen sections were cut (10 μ m thickness) on a cryostat and stained for alkaline phosphatase using an indoxyl-tetrazolium method to detect capillary endothelial cells as previously described (Ziada et al., 1984). Capillary density was defined as a mean number of capillaries per 1 mm². For immunohistochemistry, an anti α -smooth muscle actin antibody (1A4, Dako Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used as a first antibody and detected by HISTFINE SAB-PO Kit (Nichirei Corp., Tokyo, Japan) with a biotinylated anti-mouse serum and peroxidase-conjugated streptavidin. To identify arterioles and differentiate them from capillaries or venules, fifteen different microscopic fields on three different sections were selected and the positive smooth muscle cells were counted in the same manner. Arteriole density was expressed as a mean number of arterioles per field of view.

Capillary density (capillary number/mm²) was evaluated as neovascular formation at the capillary (less diameter of 10 μ m) level. Density was higher in Group A-V (Group C: 169.9 \pm 8.5 and Group A-V: 273.2 \pm 25.8^a; ^ap<0.01 versus Group C) (Table 4). Representative photomicrographs of alkaline-phosphatase stained sections are shown in Fig. 7. Immunohistochemical staining for α -actin in tunica media revealed neovascular formation at the arteriole, which is produced in the late phase of angiogenesis and defined vessels having a diameter range between 10 and 50 μ m. Arteriole densities (arteriole number/ field of view) in Group A+V and A-V were significantly higher than that of control (Group C: 4.8 \pm 0.5, Group A+V: 10.4 \pm 1.7^a, Group A-V: 12.4 \pm 1.4^a; ^ap<0.01), but the increases in Group V (6.1 \pm 0.8) and A (6.3 \pm 1.3) were of marginal significance (Table 4). Moreover, Group A-V showed a greater increase as compared with Group V (^bp<0.01) and Group A (^cp<0.01). Representative photomicrographs α -actin stained sections are also shown in Fig. 8. These quantitative analyses using alkaline-phosphatase stain and smooth muscle cell α -actin stain indicated that the combination of cytokines, especially pre-administration of angiopoietin-1, produced more functional vascular formation than "solo" administration schedules.

Table 4

	Capillary density (Capillary No./mm ²)	Arterial density (Arteriole No./field)
Control	169.9 \pm 8.5	4.8 \pm 0.5
Group V	228.0 \pm 3.2	6.1 \pm 0.8
Group A	237.2 \pm 16.6	6.3 \pm 1.3
Group A+V	242.7 \pm 22.8	10.4 \pm 1.7 ^a
Group V-A	234.6 \pm 13.1	8.6 \pm 0.9
Group A-V	273.2 \pm 25.8 ^a	12.4 \pm 1.4 ^{a, b, c}

^ap<0.01 versus control-group--

^bp<0.01 versus Group V

^cp<0.01 versus Group A

In therapeutic angiogenesis, production of functional vascular vessels is necessary for the supply of sufficient blood flow in ischemic lesions. However, some studies indicate that

VEGF, used widely in clinical studies, is of uncertain value for promotion of functional neovascularization, when VEGF is used alone.

There are two possible reasons for this consideration.

5 First, stenosis or occlusion occurs in a main artery and brings about peripheral ischemia, leading to the expression and activation of the transcription factor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). The expression of HIF-1 leads to an increase of the transcription of many angiogenic genes including those
10 encoding nitric oxide synthase and VEGF, and the cascade of angiogenesis progresses (Royen et al., 2001). It is uncertain whether the administration of VEGF gene product alone accomplishes functional angiogenesis. Recent study states that VEGF may stimulate capillary sprouting, but this response does
15 not translate into a significant improvement in collateral flow (Hershey et al., 2001). Furthermore, a study, that examined the improvement of ischemic lesions in rabbit hind limb ischemia by administration of HIF-1 α /VP16, showed more effective improvement when compared to the administration of VEGF gene alone (Vincent
20 et al., 2000). Second, although a number of clinical trials using the VEGF gene to treat ischemic diseases have been evaluated and have reported favorable results, some studies have not shown significant improvement (Rajagopalan et al., 2001). In fact, the examples described above showed that administration
25 of VEGF alone induced an increase of capillary number, but did not improve hemodynamic status, and did not mediate vascular maturation. As a result of these accumulated studies, further understanding of combination growth factor therapy or master switch genes is needed if this treatment is to produce
30 clinically beneficial angiogenesis or arteriogenesis (Blau et al., 2001; Carmeliet., 2000; Simons et al., 2000).

The above examples showed that pre-treatment with Ang-1 was more effective in improving hemodynamic status, vascular maturation in late phase angiogenesis, and vascular protection
35 against plasma leakage than administration of Ang-1 or VEGF alone or other schedules of treatment. The data suggest that stimulation by pre-administration of Ang1 promotes angiogenesis in both the early and late phases, contributing to vascular

maturation, which may be responsible for improvement of hemodynamic status and vascular protection.

There are two possible mechanisms by which pre-administration of Ang1 might contribute to the promotion of angiogenesis in the early and late phases in this model. First, circulating endothelial precursor cells (CEPs) caused by exogenous Ang1 gene may augment VEGF-induced angiogenesis. CEPs contribute to postnatal neovascularization (Asahara et al., 1999) and one recent study reports that the administration of the Ang1 gene prolongs the mobilization of CEPs compared with the administration of VEGF (Hattori et al., 2001). Overexpression of VEGF165 by adenovirus vector caused mobilization of CEPs to the peripheral blood in mice, peaking at day 2 and returning to control levels by day 14. In contrast, overexpression of Ang1 resulted in increased levels of CEPs, peaking from day 7 to 14 and returning, to control levels by day 28. Accordingly, the more effective angiogenesis produced by combination therapy of VEGF gene and Ang1 gene may occur in the pre-administration of Ang1 because each peaks of CEPs migration caused by administration of these two genes happen at the same phase. In addition, Yamashita et al. demonstrated that ECs and mural cells (pericytes and vascular smooth muscle cells) could be derived from common progenitor cells (Yamashita et al., 2000). They concluded that VEGF is necessary for the ECs differentiation, but differentiation of mural cells could occur independently of exogenous growth factors (Yamashita et al., 2000). Thus, pre-administration of Ang1 gene in the absence of exogenous VEGF until Day 15 could promote migration of circulating precursor cells (CPs) which are composed of CEPs and circulating mural precursor cells (CMPs). In the pre-administration of Ang1 schedule, the ratio of CMPs in CPs population might be higher compared with those by other administration-schedules-because the phase of VEGF administration (which increased CEPs) is later than other combinations, resulting in production of more mature vessels. Second, pre-administration of the Ang1 gene followed by the VEGF gene may stimulate clear gene switching of Ang2, an important proangiogenic factor, and augment neovascular formation. The expression of Ang2 is necessary for adult angiogenesis and this

factor plays an early role at the sites of neovascularization (Malsonpierre et al., 1997). Mandriota et al. also showed that Ang2 mRNA levels were increased by administration of VEGF and decreased by that of Ang1 (Mandriota et al., 1998). Taken
5 together, these findings suggest that in the pre-administration of Ang1 gene schedule, clearer angiogenic switching to endogenous Ang2 could occur and expression of Ang2 could promote angiogenesis longer, compared to the other combination
10 schedules. In the co-administration schedule, the expression of Ang2 would be less than the pre-administration schedules because VEGF and Ang1 have opposite effects on this gene expression. In the post-administration schedule, the period of expression of Ang2 would be shorter than in pre-administration, because of the administration of Ang1 at Day 15.

15 The present inventors evaluated VEGF-induced edema using scrotum size. The change ratio of scrotum size was sensitive for the evaluation of edema because the scrotum in rabbits is isolated from the body, does not experience strong tissue support, and has abundant areas of connective tissue spaces,
20 which facilitate the accumulation of extravasated fluid. The examples described above showed that only the pre-administration schedule prevented edema. Ang1 may promote endothelial cell firm-attachment to surrounding matrix and cells, resulting in prevention of vascular permeability caused by various stimuli
25 (Thurston et al., 1999). The molecular mechanisms by which Ang1 induces attachment remain to be elucidated, but a recent study demonstrated that Ang1 could directly support cell adhesion mediated by integrins (Carlson et al., 2001). Thurston et al. reported that the resistance to vascular leakage occurred within
30 48 hours in gene transfer of Ang1 to rats by an adenovirus vector and was verified 7 days later with injection of VEGF protein in same model (Thurston et al., 2000). Actually, the examples revealed that the pre-administration schedule blocked vascular permeability induced by VEGF. In contrast, edema
35 occurred in other treatment schedules, because the resistance to permeability induced by Ang1 did not have time to develop and prevent the vascular permeability caused by VEGF.

In summary, only the pre-administration schedule of Ang1 gene in three combination schedules of VEGF and Ang1 showed

effective improvement in ischemic lesions. In the examples, pre-administration of Ang1 gene contributed to significant increased blood pressure in the ischemic limb, improvement of blood flow in ischemic lesions, formation of mature vessels, and prevention of edema. Therefore, priming by Ang-1 gene administration may be beneficial for therapeutic angiogenesis in VEGF gene therapy.

Industrial Applicability

The present invention provides a method of administering angiopoietin prior to VEGF to obtain a high angiogenic induction effect without the adverse effects of edema. Therefore, the present invention enables gene therapy that prevents the increase in vascular permeability caused by administration of VEGF alone.

CLAIMS

1. A method of treatment by local administration, said method comprising administering an angiopoietin or a vector
5 encoding an angiopoietin prior to administration of a vector encoding an angiogenic gene or a protein encoded by an angiogenic gene.

2. The method of claim 1, wherein said local administration is intramuscular administration.

10 3. The method of claim 1 or 2, wherein said angiogenic gene is VEGF121 or VEGF165.

4. The method of any one of claims 1 to 3, wherein the angiopoietin is angiopoietin 1.

ABSTRACT

The present inventors extensively researched a method of angiogenesis with low vascular permeability by intramuscular injection of angiopoietin-1 prior to VEGF165 into rabbit ischemic hind limb models using a relatively safe plasmid vector. As a result, the present inventors developed a local administration method that produces a high angiogenic induction effect and prevents the adverse effects of edema caused by administration of VEGF alone.